



Digitized by the Internet Archive
in 2026

IMMUNCHEMIE DES KOLLAGENS

Struktur der C-terminalen Determinanten
der $\alpha 1$ -Kette vom Kalb und Vergleich mit
der homologen Struktur am Kollagen des
Kaninchens.

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München.

Vorgelegt von

Udo Becker

1 9 7 2



1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.1.1973

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. K.Kühn durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kühn für die Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Dr. R.Timpl danke ich für die Betreuung der Arbeit, für seine Anregungen und Ratschläge.

Zu Dank verpflichtet bin ich ferner allen Kollegen der Abteilung, die mir mit ihren experimentellen Erfahrungen behilflich waren.

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	3
1.1. Aufgabenstellung	7
1.2. Nomenklatur	9
1.3. Abkürzungen	10
Ergebnisse	
2. Chemische Charakterisierung von $\alpha 1$ -CB6 (Kalb).	11
2.1. Isolierung verschiedener Formen des $\alpha 1$ -CB6.	11
2.2. Mikroheterogenität des $\alpha 1$ -CB6.	14
2.3. Charakterisierung von $\alpha 1$ -CB6 durch Aminosäureanalyse.	16
2.4. Darstellung tryptischer Peptide.	18
2.5. Chemische Charakterisierung der tryptischen Peptide. Zuordnung zum C-terminalen Teil der $\alpha 1$ -Kette.	22
2.6. Fragmentierung der tryptischen Peptide	24
2.7. Endgruppenbestimmungen mit Carboxypeptidasen.	26
2.8. Diskussion	27
3. Die Bromcyanpeptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens.	29
3.1. Isolierung der CNBr-Peptide aus dem Mittelbereich der $\alpha 1$ -Kette.	31
3.2. Isolierung der N- und C-terminalen CNBr-Peptide.	32
3.3. Versuche zur Sequenzermittlung des nicht helikalen carboxyterminalen Bereichs der $\alpha 1$ -Kette.	34
3.4. Diskussion	41
4. Untersuchungen zur Struktur der antigenen Determinanten des $\alpha 1$ -CB6 vom Kalb.	46
4.1. Charakterisierung der Antiseren nach dem Verhalten in der Agglutination.	46

	Seite
4.2. Charakterisierung der Antiseren im Inhibitionstest.	49
4.3. Beziehung zwischen Mikroheterogenität des $\alpha 1$ -CB6 und serologischer Aktivität.	50
4.4. Serologische Aktivität von $\alpha 1$ -CB6 nach Abbau mit Proteasen.	51
4.5. Immunologische Aktivität von definierten Peptiden des $\alpha 1$ -CB6.	52
4.6. Kreuzreaktion von a spezifischen Antikörpern mit $\alpha 1$ -CB6 anderer Spezies.	54
4.7. Diskussion.	57
5. Experimenteller Teil.	62
5.1. Darstellung der Kollagenpräparate.	62
5.2. Darstellung der α -Ketten.	63
5.3. Chromatographische Methoden.	64
5.4. Chemische und enzymatische Spaltungen.	66
5.5. Analytische Methoden.	67
5.6. Immunologische Methoden.	70
6. Zusammenfassung.	72
7. Literatur	75

1. Einleitung.

Kollagen bildet den Hauptbestandteil des Bindegewebes. Es ist in der Haut, den Knochen, Zähnen und den Sehnen die für die Stabilität und Elastizität verantwortliche Komponente. Die Voraussetzung für die Erfüllung dieser Aufgabe ist durch seine Struktur gegeben.

Drei Polypeptidketten (α -Ketten) von je etwa 1050 Aminosäuren treten zu einem Molekül vom Molekulargewicht 290000 zusammen. Die Molekülbildung erfolgt so, daß jeweils zwei identische (α_1) und eine davon differente Kette (α_2) durch Bildung einer Tripelhelix ein Molekül der Zusammensetzung $(\alpha_1)_2\alpha_2$ ergeben (1). Die Ausbildung der tripelhelikalen Struktur erfordert einen hohen Gehalt an Iminosäuren und die Besetzung jeder dritten Position mit Glycin. Die Glycinreste liegen dann im Inneren der Tripelhelix und stabilisieren diese durch die Ausbildung von H-Brücken. Das so gebildete Molekül hat Stäbchenform und ist wenig flexibel. Bei Erwärmung zerfällt die Tripelhelix bei der für jede Spezies charakteristischen Denaturierungstemperatur in die Einzelketten. Bei Abkühlung kann sich die Tripelhelix wieder zurückbilden (Renaturierung). Einzelmoleküle können sich in Form von Fibrillen parallel aneinander lagern, wobei sie jeweils um ein Viertel ihrer eigenen Länge gegeneinander versetzt sind. Durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen den Fibrillen entstehen hochquervernetzte Strukturen, die die bekannten mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes aufweisen.

Die regelmäßige Anordnung der Fibrillen läßt sich im Elektronenmikroskop sichtbar machen. Durch Anfärbung mit Phosphorwolframsäure oder Uranylacetat erscheinen

die mit basischen und sauren Aminosäuren besetzten "polaren Bereiche" als dunkle Querstreifen (2). Eine nicht versetzte parallele Zusammenlagerung der Kollagenmoleküle wird erhalten, wenn Einzelketten oder Kettenfragmente mit ATP ausgefällt werden (Long-Spacing-Segmente). Das elektronenoptische Bild gibt dann ein grobes Bild der Primärstruktur des entsprechenden Abschnittes wieder (3).

Ein weiteres wichtiges Strukturmerkmal des Kollagens stellen die erst in jüngerer Zeit aufgefundenen nicht helikal aufgebauten Bereiche an beiden Enden des Moleküls dar. Es handelt sich um Sequenzen, bei denen die Bedingung für die Bildung der Tripelhelix - jede dritte Position Glycin - nicht erfüllt ist (4,5). Solche Bereiche sind unter Bedingungen bei denen die Tripelhelix intakt bleibt mit Proteasen abzuspalten.

Erste Hinweise auf solche proteaselabile Bereiche stammen aus Untersuchungen von Schmitt et al. (53), der zwischen ein bis drei Prozent des Kollagenmoleküls, Telopeptide genannt, mit Proteasen abspalten konnte. Da elektronenmikroskopisch nach Proteasebehandlung keine Verkürzung des Moleküls festgestellt werden kann, dürfte diese nicht mehr als etwa 20 Aminosäuren an beiden Enden des Moleküls ausmachen (7). Gleichzeitig wird beobachtet, daß kollagenes Gewebe mit Proteasen in Lösung gebracht werden kann. Es ist heute bekannt, daß jeder dieser Bereiche in definierter Position einen Lysin- oder Lysin-aldehydrest besitzt, deren Beteiligung an der Quervernetzung nachgewiesen ist (8,9).

Den nicht helikalen Bereichen kommt auch große Bedeutung für die immunologischen Eigenschaften des Kollagens zu. Die allgemein schwache Immunantwort

gegen Kollagen erklärt sich aus der gleichartigen Struktur aller bekannter Kollagene und der nur geringen Speziesvariation auf der Ebene der Aminosäuresequenz innerhalb der Ketten. Die für die helikalen Bereiche geltende Beschränkung der Variabilität der Aminosäuresequenz gilt nicht für die nicht helikalen Bereiche. So finden sich hier die markantesten Speziesvariationen (10). In Übereinstimmung damit werden die immunogenen Eigenschaften des Kollagens in erster Linie von diesen Bereichen bestimmt. Schmitt et al. (6) konnte zeigen, daß Proteasebehandlung die antigene Aktivität der Kollagenmoleküle zerstört und daß die abgespaltenen Bereiche einen Großteil der aromatischen Aminosäuren des Kollagens, insbesondere Tyrosin, enthalten. Daß Tyrosin eine maßgebliche Rolle für die Stimulierung der Immunantwort gegen Kollagen spielt, konnte von Arnon und Sela (11), sowie Kirrane und Robertson (12) nachgewiesen werden. Sie fanden eine erhöhte Immunantwort gegen Kollagen, wenn dieses zuvor mit Tyrosin angereichert worden war.

Kollagen eignet sich aufgrund dieser strukturellen Voraussetzungen für bestimmte immunchemische Fragestellungen. Die im wesentlichen gegen die nicht helikalen Bereiche gerichtete Immunantwort zumindest des Kaninchens, läßt die strukturelle Aufklärung dieser antigenen Determinanten (AD) aussichtsreich erscheinen. Voraussetzung dafür ist, daß solche Determinanten konformationsunabhängig sind, d.h. einer Spaltung mit chemischen oder enzymatischen Methoden unter Erhalt der serologischen Aktivität zugänglich sind. Beweise für Determinanten der genannten Art am Kollagen wurden von Steffen et al. (13) und Benjamini et al. (14) erbracht.

Die Voraussetzung für weitere strukturelle Aussagen über AD ist jedoch chemische Kenntnis des Kollagens. Die Aufklärung der Primärstruktur ist beim Kollagen weit vorangeschritten. Sie war möglich nach der chromatographischen Separierung der α -Ketten durch Piez et al. (1). Weiteren Fortschritt brachte die spezifische Spaltung der Ketten am Methionin mit Bromcyan nach der Methode von Gross und Witkop (16). Aus der $\alpha 1$ -Kette von Kalbskollagen entstehen dabei z.B. neun Bromcyanpeptide. Ihre Anordnung innerhalb der $\alpha 1$ -Kette ist in Abb. 1 gezeigt.

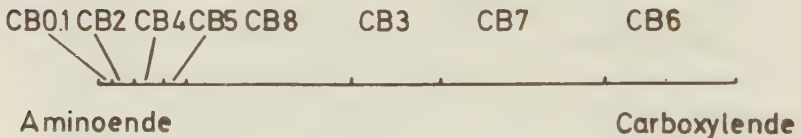


Abb.1: Anordnung der Bromcyanpeptide innerhalb der $\alpha 1$ -Kette des Kalbskollagens.

Die Protease-labile AD von Schmitt konnte von Pontz nach Bromcyanspaltung der $\alpha 1$ -Kette von Kalbskollagen auf dem carboxyterminalen Peptid $\alpha 1$ -CB6 lokalisiert werden (17). Weitere chemische Untersuchungen führten zur Sequenzaufklärung aller 217 Aminosäuren dieses Peptids, einschließlich eines C-terminalen nicht helikalen Bereichs von 25 Aminosäureresten (3,18,19). Es war damit die Grundlage für die genaue Untersuchung der AD dieses Bereichs gegeben.

1.1. Aufgabenstellung

Die im Rahmen dieser Arbeit gestellte Aufgabe gliedert sich in 4 Punkte:

1. Aufbauend auf Untersuchungen von Pontz et al. (17) sollte der Nachweis einer proteaselabilen AD am Peptid $\alpha 1$ -CB6 des Kalbskollagens mit einer Strukturaussage korreliert werden. Es war die Frage zu beantworten, ob die antigene Aktivität auf diesem Peptid nach Fragmentierung mit chemischen und enzymatischen Methoden erhalten bleibt, so daß schließlich ein eng begrenzter Sequenzabschnitt als Bindungspartner des Antikörpers angegeben werden kann.

2. Von Befunden von Rauterberg und Kühn (20) ausgehend, die am Kalbskollagen zwei chemisch voneinander verschiedene Formen des $\alpha 1$ -CB6 definiert haben, sollte die als Degradation des Carboxylendes vermutete Heterogenität strukturell untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte eine eventuelle immunologische Heterogenität beider Formen ebenfalls auf eine strukturelle Basis gebracht werden.

3. Da sich die immunchemischen Untersuchungen am Kollagen größtenteils auf Antisera vom Kaninchen stützten, ist die strukturelle Kenntnis des Kollagens des Immuntieres wünschenswert. Die Darstellung der Bromcyanpeptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens sollte Aufschluß geben, ob außer beim Kalb noch an einer weiteren Spezies der Nachweis einer carboxyterminalen nicht helikalen Sequenz erbracht werden kann. Die der Kalbsdeterminante homologe Sequenzfolge im Kaninchen sollte aufgeklärt werden. Der Vergleich beider Strukturen sollte erkennen lassen, welche Kriterien für das Erkennen einer dem Immuntier

"fremden Struktur" wichtig sind.

4. Mittels Kollagenpeptiden anderer Spezies sollte untersucht werden, inwieweit Kreuzreaktionen mit Anti-Kalbseren mit Spezifität für $\alpha 1$ -CB6 zu beobachten sind. Es sollte geprüft werden, ob sich die Kreuzreaktionen mit distinkten Aminosäuresubstitutionen korrelieren lassen.

1.2. Nomenklatur

Die Bezeichnung der Bromcyanpeptide (CNBr-Peptide) erfolgt nach Traub und Piez (10), wobei als Basis die CNBr-Peptide des Rattenhautkollagens dienen. Die Zahlen bezeichnen die Reihenfolge in der die Peptide vom Ionenaustauscher eluieren, nicht aber die Reihenfolge innerhalb der Peptidkette.

$\alpha 1$ bzw. $\alpha 2$ gibt die Kollagenkette an, aus der das Peptid stammt. $\alpha 1^{\text{Pron}}$ bedeuten aus Pronase-behandeltem Kollagen gewonnene $\alpha 1$ -Ketten.

Ungespaltene CNBr-Peptide werden mit Bindestrich aufgeführt, z.B. $\alpha 1\text{-CB}4\text{-}5$.

Peptide anderer Spezies werden homolog den Peptiden der Ratte bezeichnet. Tritt im Vergleich zur Ratte ein Methioninrest weniger auf, so wird das neu entstehende Peptid mit den durch einen Punkt getrennten Nummern der beiden homologen Rattenpeptide bezeichnet, z.B. $\alpha 2\text{-CB}3.5$.

Peptide die zusätzlich im Vergleich zur Ratte Methionin enthalten, werden mit A und B, wobei A dem N-terminalen Teil zugeordnet ist, bezeichnet, z.B. $\alpha 1\text{-CB}6\text{A}$.

Die unterschiedlichen Formen des $\alpha 1\text{-CB}6$ im Kalbs- und Kaninchenkollagen werden nach Rauterberg und Kühn (20) mit hochgestellten Indices gekennzeichnet, z.B. $\alpha 1\text{-CB}6^{\text{a}}$, $\alpha 1\text{-CB}6^{\text{Chy}}$.

Die tryptischen Peptide des $\alpha 1\text{-CB}6$ erhalten die ihrer Reihenfolge entsprechenden Nummern (24,22). Fragmente tryptischer Peptide werden entsprechend der Position die sie innerhalb des tryptischen Peptids einnehmen bezeichnet. T 16(1-30) bedeutet z.B., daß dieses Peptid die Position 1-30 des 40 Aminosäuren langen T16 umfaßt.

Peptide, die einen zu α -Aminoadipinsäure-d-semi-aldehyd umgewandelten Lysinrest enthalten, werden durch den Zusatz "Ald" (z.B. T16-17^{Ald}) gekennzeichnet.

1.3. Abkürzungen

CNBr	: Bromcyan
AD	: Antigene Determinante(n)
CPA,B,C	: Carboxypeptidase A, B, C
SLK	: säurelösliches Kollagen
NLK	: neutralsalzlösliches Kollagen
TPCK	: N-Tosylamido-2-phenyl-äthylchloromethyl- keton .
DFP	: Diisopropyl-fluorophosphat
Dansylchlorid	: 1-Dimethylamino-naphtyl-5-sulfochlorid
CM-Cellulose	: Carboxymethyl-Cellulose
SDS	: Natrium-Dodecylsulfat
Tris	: Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
ATP	: Adenosintriphosphat

Ergebnisse

2. Chemische Charakterisierung von $\alpha 1$ -CB6 (Kalb)

2.1. Isolierung verschiedener Formen des $\alpha 1$ -CB6.

Die bei der Bromcyanspaltung von $\alpha 1$ -Ketten aus säurelöslichem Kalbshautkollagen (SLK) auftretenden Peptide zeigen bei der Auftrennung an CM-Cellulose in Citratpuffer pH 3,6 das in Abbildung 2 gezeigte Elutionsdiagramm.

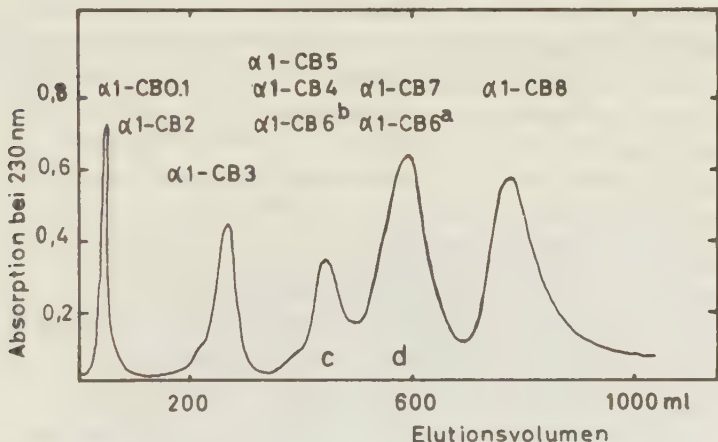


Abb.2: CM-Cellulose-Chromatographie der CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette vom Kalb.

Elutionsbedingungen: Linearer Gradient von 1000 ml 0,02 M Natriumcitrat/0,14 M NaCl, pH 3,6.

Bei der Untersuchung der Einzelfractionen mittels Disc-Elektrophorese in SDS findet sich sowohl in Fraktion c als auch d eine Bande, die dem Peptid

$\alpha 1$ -CB6 zugeordnet werden kann. Geht man von chymotryptisch vorbehandeltem Kalbskollagen aus, so wird nur in der Fraktion c entsprechenden Position eine Bande für $\alpha 1$ -CB6 gefunden.

Die Verwendung von Bromcyan-Abbaugemischen (CNBr-Gemisch) aus SLK ohne vorherige Kettentrennung ergibt für die Zusammensetzung von Fraktion c und d keinen Unterschied gegenüber reinem $\alpha 1$, so daß vom Gesamtgemisch ausgegangen werden kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden CNBr-Gemische von SLK an CM-Cellulose in Citratpuffer getrennt und die Fraktion c und d zur Präparation von $\alpha 1$ -CB6 verwendet. Aus Chymotrypsin-vorbehandeltem SLK wurde nur Fraktion c aufgearbeitet. Das in Fraktion c bzw. d enthaltene $\alpha 1$ -CB6 wurde entsprechend den Angaben von Rauterberg und Kühn (20) mit $\alpha 1$ -CB6^b bzw. $\alpha 1$ -CB6^a bezeichnet, das in Fraktion c aus chymotryptisch vorbehandeltem SLK enthaltene $\alpha 1$ -CB6 mit $\alpha 1$ -CB6^{Chy}.

Die weitere Reinigung wurde an Biogel P-150 durchgeführt. Fraktion d in Abb. 2 spaltet dabei in drei Komponenten auf. Durch Rechromatographie können reine $\alpha 1$ -CB6-Präparate erhalten werden (Abb. 3 A).

Fraktion c enthält noch Komponenten wesentlich niedrigeren Molekulargewichts ($\alpha 1$ -CB4-5, $\alpha 1$ -CB4 und $\alpha 1$ -CB5) die leicht abgetrennt werden, sowie eine als Schulter erscheinende Verunreinigung, die der Aminosäure-Analyse nach ein verkürztes $\alpha 1$ -CB7 sein könnte (Abb. 3 B).

Die Reinigung von $\alpha 1$ -CB6^{Chy} erfolgte wie $\alpha 1$ -CB6^b und wird nicht gezeigt.

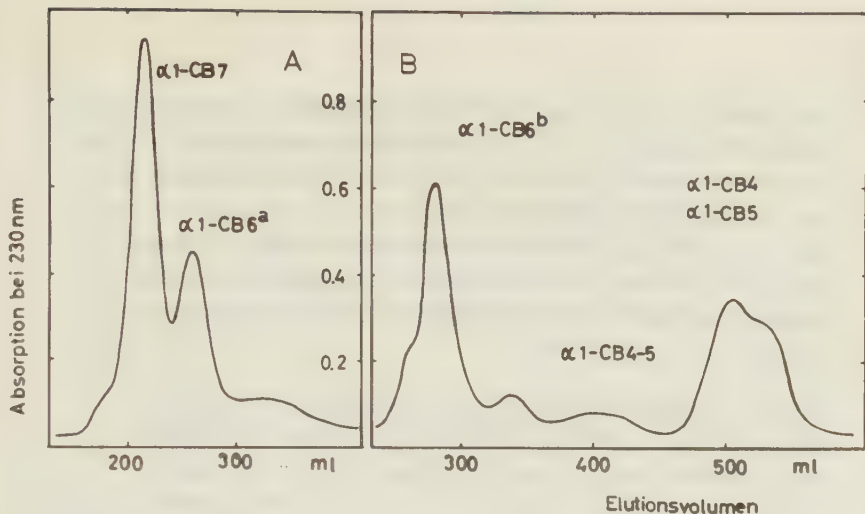


Abb. 3: Auftrennung der Fraktion d (A) und Fraktion c (B) aus Abb. 2 an Biogel P-150. Elution mit 0,05 M Natriumacetat pH 4,5.

Die Reinheit der Fraktionen wurde laufend durch Disc-Elektrophorese in SDS überprüft (Abb. 4).

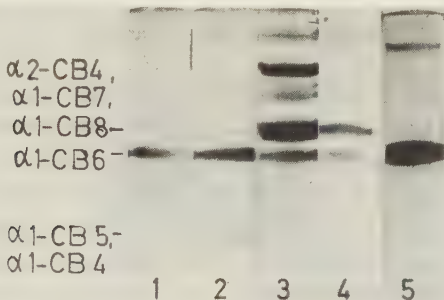


Abb. 4: Polyacrylamid-Gelelektrophorese in SDS von CNBr-Peptiden aus SLK (Kalb).
 3: Gesamtgemisch; 2: Fraktion c aus Abb. 2;
 1: $\alpha 1\text{-CB}6$; 4: Fraktion d aus Abb. 2
 5: $\alpha 1\text{-CB}6^a$ (enthält zusätzlich eine Aggregationsbande).

Zur Darstellung von $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ aus Harnstoff-extrahiertem Kollagen wurde das CNBr-Abbaugemisch aus $\alpha 1$ -Ketten unmittelbar an Biogel P-150 aufgetrennt. Es wird ein Elutionsbild erhalten, das der in Abb. 12 B auf Seite 29 gezeigten Auftrennung der CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens entspricht. Durch Rechromatographie wurde $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ elektrophoretisch rein erhalten.

Die Disc-Elektrophorese in SDS ergab für alle Formen des $\alpha 1\text{-CB6}$ nahezu identische Wanderungsdistanzen. Dagegen konnte gelchromatographisch an Biogel P-150 eine geringe Differenz des Elutionsvolumens für $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ einerseits und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{b}}$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{Chy}}$ andererseits festgestellt werden. Für $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{b}}$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{Chy}}$ errechnete sich daraus eine Verkürzung um etwa 10 % gegenüber $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ bzw. $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$.

2.2. Mikroheterogenität des $\alpha 1\text{-CB6}$.

Rechromatographie der $\alpha 1\text{-CB6}$ -Präparate bei niedriger Ionenstärke (Acetatpuffer pH 4,8) an CM-Cellulose ergab für alle Präparate ein komplexes Bild. Als Beispiel ist in Abb. 5 die Aufspaltung von $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ in mehrere Fraktionen dargestellt. Zwischen den Unterfraktionen ließ sich weder Disc-elektrophoretisch noch durch Aminosäureanalyse ein signifikanter Unterschied erkennen. Bei $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{Chy}}$ traten ebenfalls drei Subfraktionen auf, jedoch war hier jeweils eine Komponente prominent. Die serologische Charakterisierung der Unterfraktionen ergab ebenfalls kein unterschiedliches Verhalten (s. Kap. 4.3.).

Diese Mikroheterogenität kann an nahezu jedem großen CNBr-Peptid des Kollagens mehr oder weniger ausgeprägt festgestellt werden (4,20). Als Ursache kommen

partielle Deamidierung während des CNBr-Abbaus in saurem Milieu, sowie unterschiedliche Hydroxylierung von Prolin und Lysin in Frage. Degradation durch Proteasen, wie sie für die später beschriebene chemische Heterogenität verantwortlich ist, oder unspezifische Spaltung während des CNBr-Abbaus erscheint aufgrund der analytischen Kriterien unwahrscheinlich.

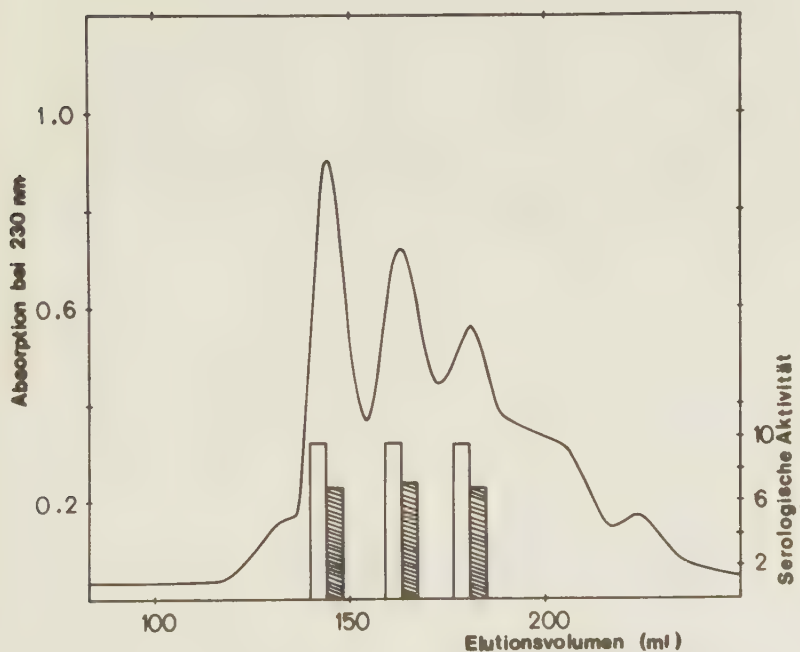


Abb. 5: CM-Cellulose-Chromatographie von $\alpha 1$ -CB6^a bei pH 4,8 in 0,02 M Natriumacetat. Linearer Gradient 250/250 ml von 0-0,16 M NaCl. Zusätzlich eingetragen ist die serologische Aktivität der Subfraktionen im Agglutinationstest (weiße Balken) und im Inhibitionstest (schraffierte Balken). Titration mit Antiseren der Gruppe I.

2.3. Charakterisierung von $\alpha 1$ -CB6 durch
Aminosäureanalyse.

Die Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Formen des $\alpha 1$ -CB6 ist in Tabelle 1 aufgeführt. Es ist ersichtlich, daß kein wesentlicher Unterschied zwischen $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ -CB6^U besteht, außer daß bei letzterem ein zusätzlicher dritter Tyrosinrest auftritt. Deutliche Unterschiede jedoch bestehen zwischen diesen beiden Formen und den kürzeren (s.S. 14) Formen $\alpha 1$ -CB6^b und $\alpha 1$ -CB6^{Chy}. Hier fällt der geringere Gehalt an aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Histidin auf und auch der Gehalt an Leucin erscheint signifikant erniedrigt. $\alpha 1$ -CB6^b ist von $\alpha 1$ -CB6^{Chy} auf dieser Ebene nicht unterscheidbar.

	$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$	$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$	$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{b}}$	$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{chy}}$
3-Hyp	1	1	1	1
4-Hyp	15	16	15	15
Asp	10	10	10	8,2
Thr	4,1	4,3	3,9	3,5
Ser	11	11	9,4	7,8
Glu	15	15	13	13
Pro	34	34	30	32
Gly	69	68	67	69
Ala	21	22	20	20
Val	2,8	2,7	2,6	2,5
Ile	3,0	2,8	2,9	2,8
Leu	5,9	5,1	4,1	4,0
Tyr	2,6	1,6	0,8	0,7
Phe	2,1	2,1	1,4	0,9
Hyl	1,9	1,7	1,7	1,9
His	1,9	1,6	0,7	1,0
Lys	4,0	3,8	4,0	3,5
Arg	12	12	10	11
Summe	217	216	198	196

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Formen des $\alpha 1\text{-CB6}$ (Kalb):

2.4. Darstellung tryptischer Peptide.

Zur Charakterisierung der chemischen Heterogenität der verschiedenen Formen des $\alpha 1$ -CB6 (a,b,U) wurden die tryptischen Peptide des carboxyterminalen Bereichs isoliert. Für die Wahl von Trypsin als Spaltungsenzym waren serologische Gründe ausschlaggebend (s. Kap.4.4.). Tryptische Abbaugemische waren noch serologisch aktiv, so daß mit Hilfe der Antiseren spezifische Fraktionierung möglich war.

Für das weitere Verständnis wird die Zuordnung der untersuchten Peptide zum $\alpha 1$ -CB6 in Abb. 6 S. 19 dargestellt.

Die Fraktionierung der tryptischen Peptide von $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ -CB6^b wurde an Dowex 1 X2 vorgenommen. Das Elutionsdiagramm ist in Abb. 7 für $\alpha 1$ -CB6^a dargestellt, $\alpha 1$ -CB6^b zeigt im Vergleich dazu nur minimale Unterschiede.

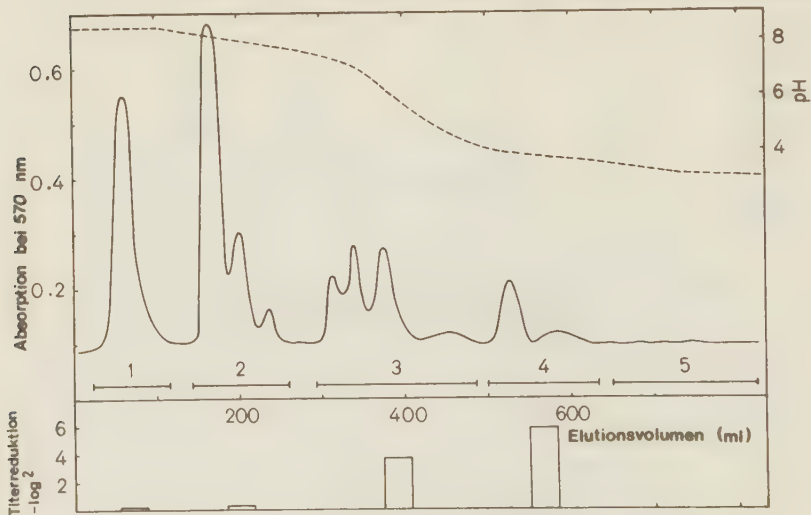


Abb. 7: Auftrennung der tryptischen Peptide von $\alpha 1$ -CB6^a an Dowex 1 X 2 bei 45°C.
Elutionsbedingungen: 1. 100 ml 1 % Collidinacetat pH 8,5. 2. 100 ml 1% Collidin-/1% Pyridinacetat pH 7,5. 3. Linearer Gradient von 300 ml 1% Coll./1% Pyr-Acetat pH 7,5 und 300 ml 2n Essigsäure.
Das Inhibitionsbild zeigt die serologische Aktivität der Subfraktionen.

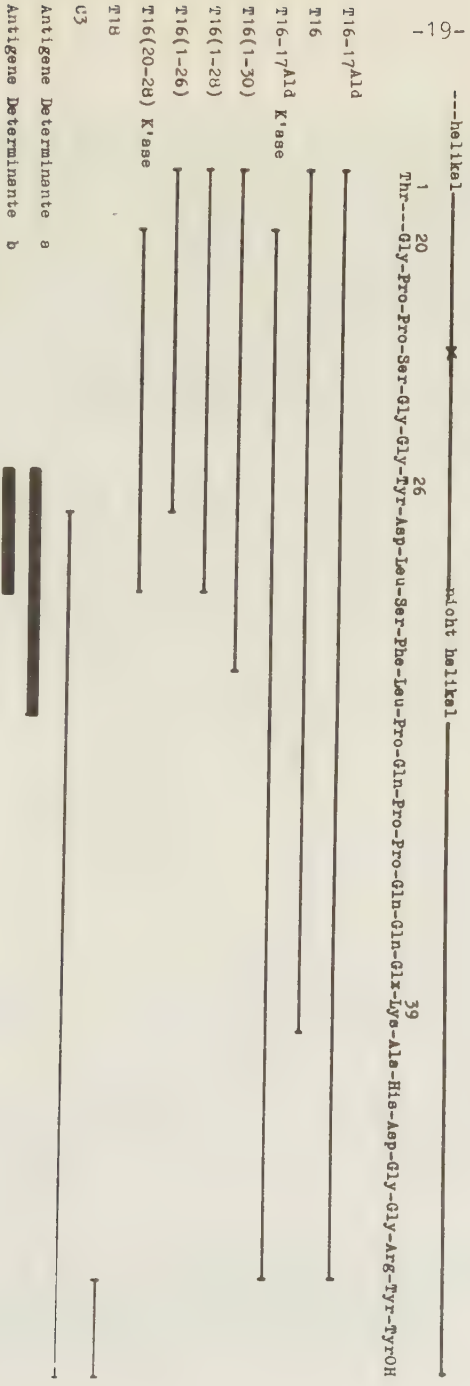


Abb.6: Sequenz des nicht helikalen C-terminalen Bereichs der α 1-Kette
 des Kalbskollagens und Lage der carboxyterminalen Peptide.
 Die schwarzen Balken geben die minimale Größe
 der a- bzw. b-Determinante an.

Inhibitionsteste mit den Fraktionen 1 bis 5 ergab eine weitgehende Wiedergewinnung der Aktivität in Fraktion 4.

Die Auftrennung der Fraktion 4 an Biogel P-10 (Abb. 8) ergab die Peptide T16-17^{Ald} mit einer Länge von 45 Aminosäuren und T16(1-28), sowie das von v.d. Mark et al. (24) beschriebene T 9 von 12 Aminosäuren, welches nicht aus dem C-terminalen Bereich stammt. Die Fraktion 4 analoge Position von trypsingespaltenem α 1-CB6^b ergab lediglich Peptid T16(1-28) und T 9, jedoch nicht das längere T16-17^{Ald}.

Elution der Dowex-Säule mit 2 n Essigsäure lieferte Fraktion 5, aus der nach Chromatographie an Biogel P-10 Peptid T16(1-30) erhalten wurde. Dieses wurde sowohl in α 1-CB6^a als auch α 1-CB6^b aufgefunden, doch handelte es sich jeweils nur um geringe Mengen, so daß auch keine Absorption bei 570 nm im Elutionsdiagramm sichtbar war.

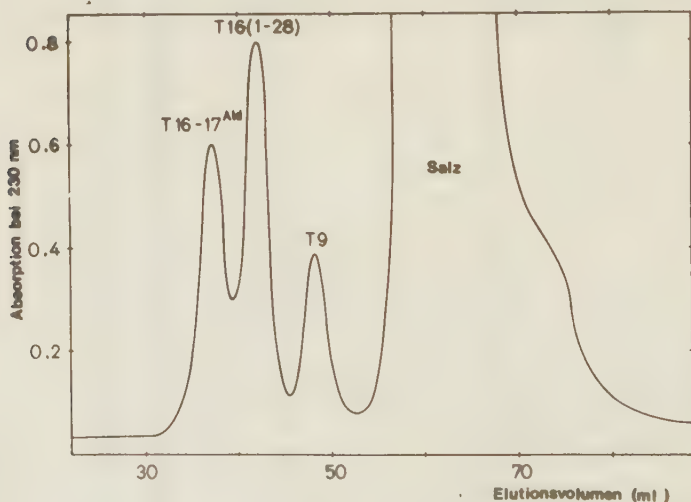


Abb. 8: Gelchromatographie an Biogel P-10 der serologisch aktiven Fraktion 4 in Abb. 7.
Elution mit 0,05 M Natriumacetat pH 4,8.
Die mit "Salz" bezeichnete Fraktion besteht aus restlichem Pyridin-/Collidinacetat der Dowex-Trennung.

Die analog an tryptischen Peptiden des $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ ausgeführte Auftrennung an Dowex und anschließende Trennung von Fraktion 4 an Biogel P-10 ergab ein einheitlich erscheinendes Peptid in der Region von 40 Aminosäuren, sowie T 9. Es ergab sich kein Hinweis für das Auftreten des kürzeren T16(1-28) und auch Fraktion 5 ergab kein T16(1-30). Zur Darstellung serologisch aktiver Peptide aus $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ wurde daher auf die Dowex-Fraktionierung verzichtet und das tryptische Gemisch unmittelbar an Biogel P-10 aufgetrennt. Abb. 9 zeigt das Elutionsdiagramm der tryptischen Peptide von $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$.

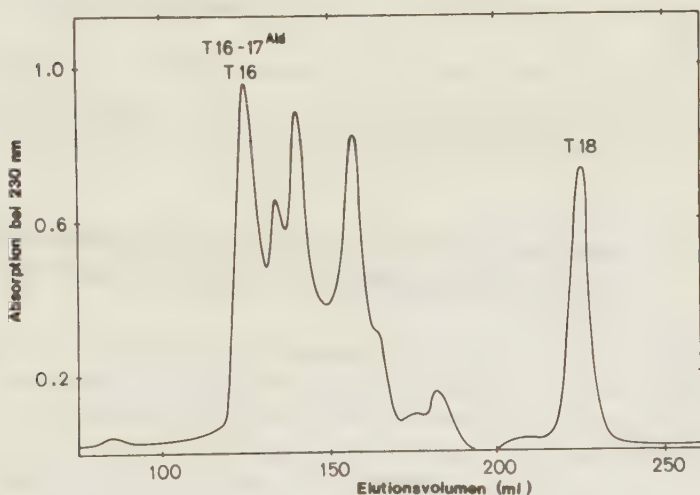


Abb. 9: Auftrennung der tryptischen Peptide von $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ an Biogel P-10. Elution mit 0,05 M Natriumacetat pH 4,5.

Die zuerst eluierende Fraktion konnte nach Rechromatographie unter identischen Bedingungen an Phosphorcellulose in die Peptide T16 und T16-17^{Ald} aufgetrennt werden (Abb. 10).

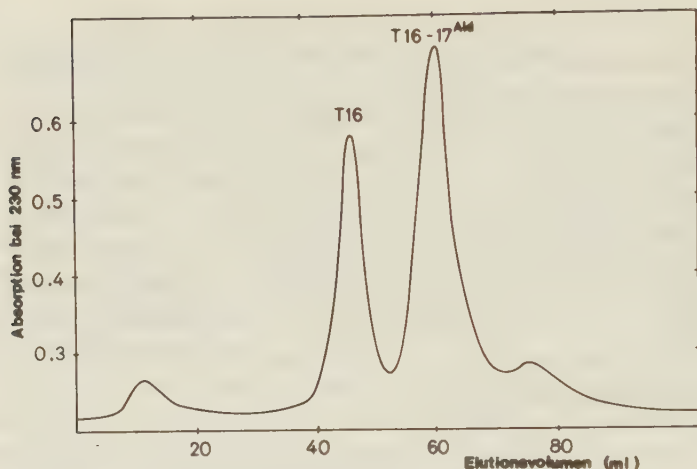


Abb. 10: Rechromatographie der ersten Fraktion in Abb. 9 an Phosphorcellulose.
Elutionsbedingungen: 1/1000 M Natriumacetat pH 3,6.
Konkaver Gradient 100/100 ml von 0-0,5 M NaCl.

2.5. Chemische Charakterisierung der tryptischen Peptide. Zuordnung zum C-terminalen Teil der $\alpha 1$ -Kette.

In Tabelle 2 S. 23 sind die Aminosäuren-Analysen der 4 tryptischen Peptide, deren Fragmentierungspeptide und dem aus chymotryptischem Abbau von $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ von Rauterberg et al.(19) gewonnene Peptid $\alpha 1\text{-CB6 C3}$ wiedergegeben.

Es ist ersichtlich, daß die tryptischen Peptide untereinander Ähnlichkeit aufweisen; insbesondere ist jedes kleinere Peptid widerspruchslös in dem jeweils nächst größeren Peptid enthalten. T16-17^{Ald} weist aber kein Lysin auf. Nach Perameisensäure-Oxydation kann jedoch α -Aminoadipinsäure nachgewiesen werden, so daß der Lysinrest wahrscheinlich in Form des α -Aminoadipinsäure-d-semialdehyds (Allysin) vorliegt. Dieser wird von Trypsin nicht gespalten und gibt Anlaß zu dem Doppelpeptid T16-17^{Ald}, während die ebenfalls vorkommende freie Lysinform T 16 liefert. Auffallend bei T 16 und

	Tr16-17 ^{Ald}	Tr 16	Tr16-17 ^{Ald} K'ase	Tr16(1-30)	Tr16(1-28)	Tr16(1-26)	Tr16(20-28) K'ase	03 ^{Ald} *
4-Hyp	3,3	3,3	-	3,4	3,5	3,5	-	-
Asp	3,4	2,4	2,0	2,1	2,2	1,2	0,8	2,0
Thr	1,0	1,0	-	1,0	1,1	1,2	-	-
Ser	2,0	2,0	2,0	2,1	1,2	1,0	0,9	1,0
Glu	3,3	3,3	3,8	0,4	-	-	-	3,7
Pro	10,7	10,8	5,3	7,8	7,4	7,5	2,4	3,2
Gly	11	9,3	5,7	9,2	9,1	9,2	3,4	2,3
Ala	3,5	2,3	1,2	2,1	2,2	1,9	-	1,1
Leu	2,2	2,2	1,8	1,0	1,1	-	0,7	2,0
Tyr	0,9	1,0	0,9	1,0	0,9	1,0	0,6	1,7
Phe	1,1	1,0	1,0	1,0	-	-	-	1,0
His	1,2	-	1,0	-	-	-	-	1,0
Lys	-	1,0	-	-	-	-	-	-
Arg	1,0	-	1,0	-	-	-	-	1,0
Summe	44***	39**	25	30	28	26	9	20***

* siehe Referenz (5)
 ** korrigiert nach Sequenzanalyse (19)
 *** ohne Lysin-aldehyd

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung der C-terminalen Peptide aus $\alpha 1$ -CB6 (Kalb).

T16-17^{Ald} ist der für Kollagen unüblich niedrige Glycin-gehalt. Beide Peptide können daher zumindest in einem Teil keine tripelhelikale Struktur annehmen.

2.6. Fragmentierung der tryptischen Peptide.

Durch weitere enzymatische Fragmentierung der tryptischen Peptide wurden genauere Aussagen über die Länge der jeweiligen nicht helikalen Bereiche erhalten. Außerdem wurden die Fragmente für die Ermittlung der Größe der AD in serologischen Testen eingesetzt (s. Kap. 4.5.).

Das Peptid T16(1-28) weist gegenüber einem von Wendt et al. (22) beschriebenen Peptid α 1-CB6 C2 T5 lediglich einen zusätzlichen Asparaginsäurerest und einen Leucinrest auf. α 1-CB6 C2 T5 wurde aus chymotryptisch vorbehandeltem SLK nach Spaltung des α 1-CB6^{Chy} mit Chymotrypsin als das C-terminale tryptische Peptid des α 1-CB6 C2 erhalten. Es enthält 26 Aminosäuren, von denen 22 dem helikalen Bereich angehören. Nach der hier verwendeten Nomenklatur heißt es T16(1-26). Durch Chymotrypsinabbau von T16(1-28) wurde gezeigt, daß die beiden zusätzlichen Reste abgespalten werden können und daß das Restpeptid T16(1-26) mit dem erwähnten identisch war. Die Abspaltung der beiden Aminosäuren erfordert allerdings drastische Bedingungen, es wurde in diesem Fall 8 h bei einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:50 gespalten. Aufgrund der bekannten Herkunft des Peptids α 1-CB6 C2 T5 kann geschlossen werden, daß Asparaginsäure und Leucin den C-terminalen Teil des ursprünglichen Peptids darstellten. Die Isolierung des abgespaltenen Dipeptids gelang jedoch nicht.

Aus der Aminosäureanalyse von T16-17^{Ald} geht hervor, daß das Peptid aus einem helikalen und einem nicht helikalen Teil zusammengesetzt ist. Es wurde versucht, mit Kollagenase den helikalen Teil zu Tripeptiden zu verdauen, um den nicht helikalen Teil, der ungespalten bleiben sollte, zu gewinnen.

Eine nach dieser Vorstellung durchgeführte Spaltung ergab nach Auftrennung an Biogel P-10 (Abb. 11) ein nicht helikales Peptid von 25 Aminosäuren, das große Ähnlichkeit mit dem von Stark et al. (5) beschriebenen C-terminalen chymotryptischen Peptid des $\alpha 1$ -CB6^a, $\alpha 1$ -CB6 C3, aufweist (s. Abb. 6, S. 19). Es wurde abweichend von der üblichen Nomenklatur als T16-17^{Ald}-K'ase bezeichnet. Wird die gleiche Spaltung an T16(1-28) durchgeführt, so wird nach zweimaliger Chromatographie an Biogel P-2 ein ebenfalls nicht helikales Peptid isoliert. Nach Durchführung einer präparativen Dünnschichtchromatographie kann ein Peptid von 9 Aminosäuren erhalten werden, T16(20-28)K'ase.

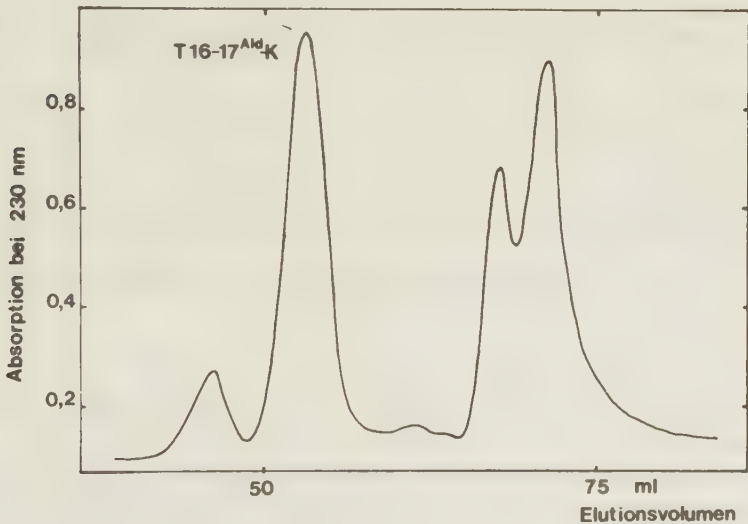


Abb. 11: Chromatographie des Kollagenase-Abbaugemisches von T16-17^{Ald} an Biogel P-10.
Elution mit 0,05 M Natriumacetat pH 4,5.

2.7. Endgruppenbestimmungen mit Carboxypeptidasen.

Zur weiteren Untersuchung zur Struktur der Peptide wurden Endgruppenbestimmungen mit Carboxypeptidasen vorgenommen und mit Endgruppenbestimmungen der Ausgangspeptide $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$, $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{b}}$ verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Peptid	Carboxy- Peptidase	Abbau- zeit(h)	freigesetzte Aminosäuren ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ Peptid)		
$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$	B	2,5	Tyr 1,2	Arg 0,6	
		4	Tyr 1,5	Arg 0,6	
		6	Tyr 1,4	Arg 0,8	
$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$	B	4	Tyr 0,7	Arg 0,4	Ser 0,3
		6	Tyr 0,7	Arg 0,5	Ser 0,4
$\alpha 1\text{-CB6}^{\text{b}}$	C	32	Leu 0,23		
T16(1-30)	A	1	Phe 0,9	Ser 0,8	Leu 0,8
T16(1-28)	C	32	Leu 0,5		
T16(1-26)	B	6	Tyr 0,45		

Tabelle 3: Endgruppenbestimmung mit Carboxypeptidasen.

Man erkennt, daß sowohl $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ als auch $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ Tyrosin als Endgruppe aufweisen, sich jedoch in der Tyrosinausbeute unterscheiden. Es muß angenommen werden, daß beim $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ zwei Tyrosinreste und ein Argininrest abgespalten werden, während beim $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ nur jeweils ein Rest Tyrosin und Arginin abgespalten wird. Zusammen mit der Erkenntnis, daß sich $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ in der Aminosäureanalyse lediglich durch einen Tyrosinrest bei letzterem unterscheiden, kann angenommen werden, daß die Sequenz des $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ mit ...Arg-Tyr-TyrOH endet, während beim $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{a}}$ die Sequenz ...Arg-TyrOH vorliegt. Der beiden gemeinsame Argininrest findet sich als die tryptische Endgruppe des T16-17^{Ald} wieder. Nach Trypsinabbau von $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{U}}$ sollte daher ein Dipeptid von zwei Tyrosinresten auftreten. Dieses wurde an Biogel P-10 (Abb. 9) als weit hinter dem Salz-

peak eluierendes Peptid T 18 durch Aminosäureanalyse und Dünnschichtchromatographie identifiziert. Als Vergleich diente synthetisches Tyrosyl-Tyrosin. In Übereinstimmung damit konnte aus tryptischen Abbaugemischen von $\alpha 1$ -CB6^a am Aminosäureanalysator freies Tyrosin nachgewiesen werden.

Die Abspaltung von Leucin bei T16(1-28) und $\alpha 1$ -CB6^b läßt vermuten, daß T16(1-28) das C-terminale tryptische Peptid dieser Form des $\alpha 1$ -CB6 dargestellt. T16(1-30) tritt bei Trypsinabbau von $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ -CB6^b in geringen Mengen auf; Behandlung mit CPA liefert zu gleichen Teilen Leucin, Serin und Phenylalanin. Für kinetische Studien stand nicht genügend Material zur Verfügung. Jedoch ordnet es sich in die Reihe der übrigen Peptide ein, wenn man annimmt, daß es um die Sequenz Ser-Phe länger als T16(1-28) ist.

Mit Hilfe der kürzlich aufgeklärten Sequenz des C-terminalen nicht helikalen Teils des $\alpha 1$ -CB6 (19) ist auf der Basis der strukturellen Untersuchung der Peptide ihre zwanglose Einordnung innerhalb dieser Sequenz möglich. In Abb. 6 S. 19 ist die Zuordnung aller isolierter Peptide anhand der Sequenz aufgezeigt.

2.8. Diskussion.

Alle untersuchten Peptide gehören dem C-terminalen Teil des $\alpha 1$ -CB6 an. Es wurde gezeigt, daß $\alpha 1$ -CB6^U die längste und wahrscheinlich genuine Struktur des C-Terminus der $\alpha 1$ -Kette enthält und daß alle anderen Formen Artefakte sind. Bei der bisher üblichen langdauernden Reinigungsoperation von Kollagen treten offenbar Verkürzungen der nicht durch Tripelhelix-Bildung geschützten Teile ein. Diese Degradationen sind Ausdruck für das Auftreten mehrerer Erscheinungsformen des $\alpha 1$ -CB6. Die hier erfaßten

Formen sind sicherlich nicht die einzigen. Dies zeigt das Auftreten von T16(1-30), zu dem kein entsprechendes CNBr-Peptid separiert werden konnte, sowie die Freisetzung beträchtlicher Mengen von Serin beim Abbau von $\alpha 1\text{-CB6}^a$ mit CPB.

Bei der Extraktion von Kalbshaut mit 8 M Harnstoff wird eine Degradation des Moleküls vermieden, so daß als einzige Form $\alpha 1\text{-CB6}^U$ gefunden wird. Nachdem bekannt ist, daß 8 M Harnstoff auf Proteine stark denaturierend wirkt, liegt der Schluß nahe, daß Harnstoffextraktion die Aktivität von Gewebsproteasen in der Haut zerstört.

Die Degradation des C-Terminus kann auch an hochgereinigten, bei -20°C in dest. Wasser in Gegenwart von EDTA eingefrorenen Kollagenlösungen fortschreiten. Kollagenpräparationen, die mehrere Monate gelagert waren, zeigten im Vergleich zu sofort aufgearbeitetem Material eine Abnahme der Ausbeute an $\alpha 1\text{-CB6}^a$. Ungeklärt bleibt die Tatsache, daß zwar $\alpha 1\text{-CB6}^b$ nach Trypsinabbau ausschließlich T16(1-28) lieferte, daß aber $\alpha 1\text{-CB6}^a$ sowohl T16-17^{Ald}, als auch T16(1-28) ergab, obwohl das Ausgangsmaterial chemisch und chromatographisch sowie nach immunologischer Spezifität als einheitliches und distinktes Peptid erschien. Eine nachträgliche Spaltung von T16-17^{Ald} durch Nebenaktivitäten des Trypsins konnte durch Nachinkubation mit Trypsin ausgeschlossen werden; es trat keine Spaltung ein. Möglicherweise liegen Verunreinigungen der $\alpha 1\text{-CB6}$ -Präparate durch Gewebsproteasen vor, die durch das beim Trypsinabbau verwendete alkalische Medium aktiviert werden.

Aus säurelöslichem Kollagen kann kein T 16 erhalten werden. Aus Harnstoff-extrahiertem $\alpha 1\text{-CB6}^U$ dagegen tritt T 16 neben T16-17^{Ald} auf, wobei T 16 mengenmäßig etwa ein Drittel ausmacht. Die Extraktion von SLK wird nach einer vorhergehenden erschöpfenden Extraktion bei neutralem pH durchgeführt. Ein Großteil der monomeren Moleküle ist somit entfernt. Es ist denkbar, daß die saure Extraktion labile Quervernetzungen aufbricht, an denen bevorzugt Lysinaldehyde der nicht helikalen Bereiche beteiligt sind.

3. Die Bromcyanpeptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens.

Um Kenntnisse über das Kollagen des Immuntieres, dem Kaninchen, zu erhalten wurden die CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette aus Kaninchenhaut dargestellt. Aufgrund der Erfahrungen mit Kalbshautkollagen wurde für die Darstellung der CNBr-Peptide des Kaninchens von Harnstoff-extrahierten $\alpha 1$ -Ketten ausgegangen. Für Vergleiche wurden auch aus neutral-salzlöslichem Kollagen isolierte $\alpha 1$ -Ketten zur Bromcyan-spaltung und Isolierung der Peptide herangezogen. Ketten-trennung und CNBr-Spaltung wurde wie beim Kalb beschrieben vorgenommen, die Abbaugemische jedoch direkt lyophilisiert und nicht entsalzt.

Die Auftrennung der CNBr-Peptide an Biogel P-4 ergab drei Fraktionen (Abb. 12 A). Fraktion eins enthielt die zentralen CNBr-Peptide $\alpha 1$ -CB2 bis $\alpha 1$ -CB8, die beiden anderen Fraktionen enthielten die terminalen CNBr-Peptide. Die drei Fraktionen wurden getrennt weiter gereinigt.

Die Aminosäurezusammensetzung der erhaltenen CNBr-Peptide, sowie die Summe aller Peptide im Vergleich zur Zusammensetzung der gesamten $\alpha 1$ -Kette ist in Tabelle 4 enthalten.

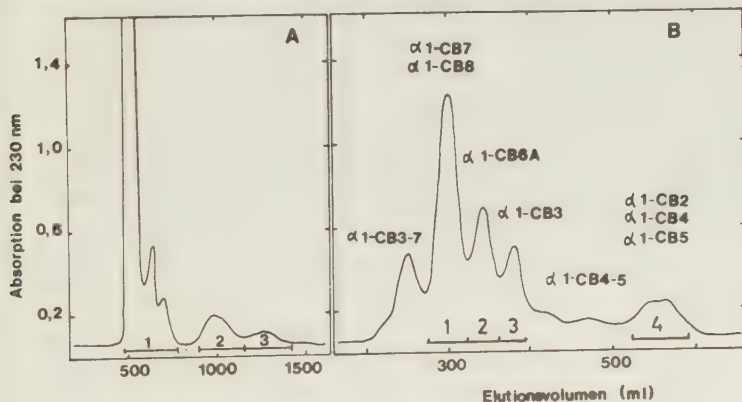


Abb. 12 A: Auftrennung der CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens an Biogel P-4. Elution mit 0,1 M Essigsäure.

B: Auftrennung von Fraktion 1 in Abb.12 A an Biogel P-150. Elution mit 0,05 M Na-Acetat pH 4,5.

	α^1 - CBO	α^1 - CB1	α^1 - CB2	α^1 - CB3	α^1 - CB4	α^1 - CB5	α^1 - CB6A	α^1 - CB6B	α^1 - CB7	α^1 - CB8	Summe	α^1
3-Hyp	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-	-	0,6	0,5
4-Hyp	-	-	5,4	14,8	5,7	2,7	15,7	-	25,1	29,0	98,4	103,6
Asp	-	1,1	-	7,2	3,1	3,0	9,0	1,1	13	13	50	47
Thr	-	-	-	0,4	1,0	-	4,1	-	6,6	7,1	19	19
Ser	-	2,7	3,1	3,8	-	2,0	8,6	-	6,9	6,2	34	36
Hse	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1	0,8	-	1,1	1,0	9	8,9*
Glu	1,0	1,2	4,2	16	3,2	3,3	14	3,1	18	22	85	88
Pro	-	2,2	6,6	15,2	5,0	2,3	30,4	3,1	36,0	33,0	133,8	130,5
Gly	-	3,2	12	49	16	12	66	3,4	90	94	345	331
Ala	-	1,2	1,3	19	4,0	4,2	19	2,0	32	36	118	123
Val	-	1,8	-	4,3	-	-	2,8	-	7,8	5,8	23	21
Ile	-	-	-	-	-	-	3,6	-	2,7	1,1	8	8,0
Ieu	-	-	1,1	3,2	2,0	1,1	4,1	-	4,7	4,2	20	20
Tyr	-	1,8	-	-	-	-	-	1,8	-	-	4	3,5
Phe	-	-	1,0	3,0	-	0,9	2,8	-	3,1	3,0	14	13
Hy1	-	-	-	0,3	-	0,9	1,5	-	0,6	0,6	3,9	4,0
His	-	-	-	-	-	1,0	1,0	-	-	-	2	2,6
Lys	-	0,9	-	4,9	2,0	1,9	3,7	0,8	10,6	9,3	34,1	30,9
Arg	-	-	1,0	6,2	3,7	1,1	11	1,9	14	16	55	51
Summe	2	17	36	147	47	37	200	17	273	281	1057	1043

* als Methionin bestimmt

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der CNBr-Peptide der α^1 -Kette des Keninchenkollegens.

1
2
3

3.1. Isolierung der CNBr-Peptide aus dem Mittelbereich der $\alpha 1$ -Kette.

Das nach der Auftrennung an Biogel P-4 als Fraktion eins (Abb. 12 A) erscheinende Peptidgemisch wurde weiter an Biogel P-150 wie in Abb. 12 B gezeigt, aufgetrennt und die Fraktionen gesammelt. Die mit $\alpha 1$ -CB3-7 und $\alpha 1$ -CB4-5 bezeichneten Fraktionen wurden in Analogie zum Kalbskollagen als ungespaltene Peptide angenommen und nicht weiter untersucht. Die Fraktionen 1-3 wurden nach Rechromatographie unter identischen Bedingungen an CM-Cellulose nach Butler et al. (4) chromatographiert. Dabei erwies sich 2 ($\alpha 1$ -CB6A) und 3 ($\alpha 1$ -CB3) als einheitlich, während die Fraktion 1 in zwei Peptide ($\alpha 1$ -CB8 und $\alpha 1$ -CB7) aufspaltete. Die Reinheit der Peptide wurde durch Disc-Elektrophorese in SDS geprüft (Abb. 13).

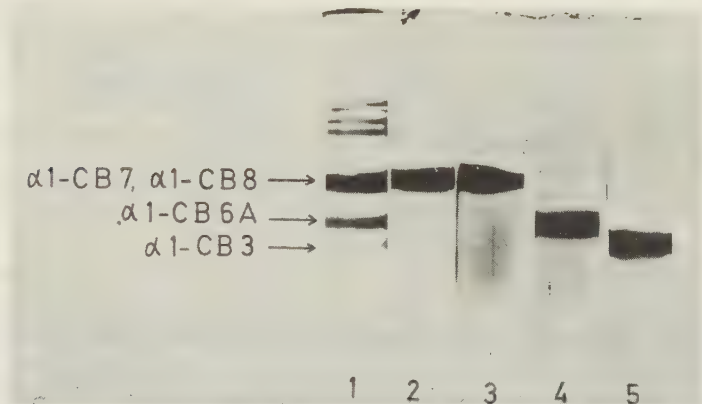


Abb. 13: Polyacrylamid-Gelelektrophorese in SDS von CNBr-Peptiden der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens.
1: Gesamtgemisch; 2: $\alpha 1$ -CB8; 3: $\alpha 1$ -CB7;
4: $\alpha 1$ -CB6A; 5: $\alpha 1$ -CB3.

Fraktion 4 separierte sich an Phosphorcellulose nach Kang et al. (25) in drei Peptide, in Abb. 14 mit $\alpha 1$ -CB5, $\alpha 1$ -CB4 und $\alpha 1$ -CB2 bezeichnet. Diese wurden nach zweimaliger Passage über Biogel P-10 chromatographisch einheitlich erhalten.

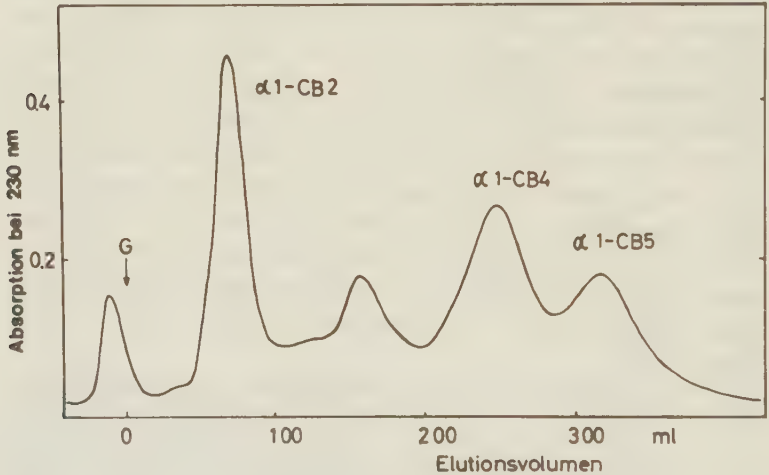


Abb. 14: Auftrennung der in Abb. 12 B zuletzt eluierenden Fraktion an Phosphorcellulose.
Elutionsbedingungen: Linearer Gradient von 400 ml 1/1000 M Natriumacetat pH 3,6 bis 400 ml 1/1000 M Natriumacetat/0,6 M NaCl pH 3,6.

3.2. Isolierung der N- und C-terminalen CNBr-Peptide.

Die nach Auftrennung des CNBr-Peptidgemisches an Biogel P-4 erhaltenen Fraktionen 2 und 3 aus Abb.12 A, S. 29 wurden getrennt an Phosphorcellulose chromatographiert. Fraktion 2 lieferte 2 Peptide, $\alpha 1$ -CB1 und $\alpha 1$ -CB1^{Ald} (Abb.15 A, S.33), die sich in der Aminosäurezusammensetzung nur durch den Ersatz eines Lysinrestes durch einen Lysinaldehydrest bei $\alpha 1$ -CB1^{Ald} unterschieden.

Fraktion 3 zeigte ein komplexes Bild (Abb. 15 B). Die erste

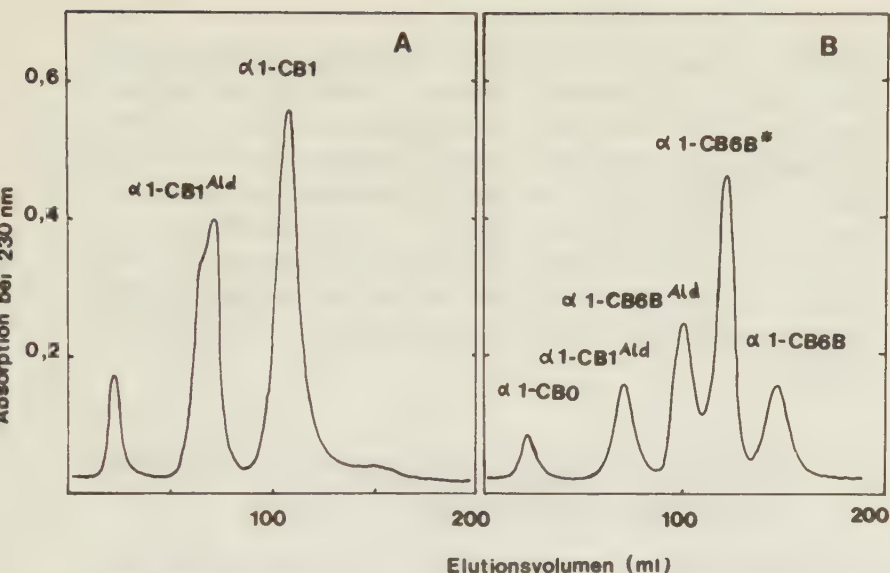


Abb. 15 A: Rechromatographie von Fraktion 2 in Abb.12 A an Phosphorcellulose.
 Elution mit 1/1000 M Natriumacetat pH 3,6. Kon-
 kaver Gradient 100/100 ml von 0 bis 0,3 M NaCl.

B: Rechromatographie von Fraktion 3 in Abb. 12 A
 an Phosphorcellulose.
 Elution wie unter A.

Fraktion enthielt das Dipeptid $\alpha 1\text{-CBO}$ (Glx-Hse) zusammen mit nicht retardiertem Material. Da die N-terminale Aminosäure in blockierter Form, wahrscheinlich als Pyrrolidon-carbonsäure vorliegt, ließ sich das Peptid über eine Säule von Dowex 50 X 2 von Aminogruppen enthaltenden Verunreinigungen abtrennen. Die zweite Fraktion konnte als $\alpha 1\text{-CB1}^{\text{Ald}}$ identifiziert werden. Es gerät aus nicht bekannten Gründen teilweise mit in diesen Fraktionierungsbereich.

Die drei anschließenden Fraktionen erwiesen sich als untereinander sehr ähnliche Peptide. Allen gemeinsam ist ein hoher Aromatengehalt und ihre Aminosäurezusammensetzung

entspricht einer nicht helikalen Struktur. Da keines der Peptide Homoserin enthält, müssen sie als die carboxyterminalen CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette angesehen werden. Zwei der Peptide, $\alpha 1$ -CB6B und $\alpha 1$ -CB6B^{Ald} unterscheiden sich lediglich im Lysingehalt, analog der Peptide des N-terminalen Bereichs, $\alpha 1$ -CB1 und $\alpha 1$ -CB1^{Ald}. Perameisensäureoxydation des lysinfreien Peptids $\alpha 1$ -CB6B^{Ald} bewies die Anwesenheit eines Lysinaldehyds. Das dritte Peptid, $\alpha 1$ -CB6B* enthält einen Alanin- und einen Argininrest weniger als $\alpha 1$ -CB6B.

3.3. Versuche zur Sequenzermittlung des nicht helikalen carboxyterminalen Bereichs der $\alpha 1$ -Kette.

Beim Kalbskollagen bildet $\alpha 1$ -CB6 mit 217 Aminosäuren das Carboxylende der $\alpha 1$ -Kette. Durch chymotryptische Spaltung werden 3 Peptide, $\alpha 1$ -CB6-C1, -C2 und -C3 erhalten (5). Peptid C3 mit einer Länge von 20 Aminosäuren repräsentiert im wesentlichen die nicht helikale C-terminale Sequenz. Beim Kaninchen enthält die dem $\alpha 1$ -CB6 beim Kalb entsprechende Sequenz einen im nicht helikalen Bereich gelegenen zusätzlichen Methioninrest, wodurch ein 10. CNBr-Peptid, $\alpha 1$ -CB6B, entsteht. Für die Untersuchungen dieses Sequenzbereiches muß daher von den Peptiden $\alpha 1$ -CB6A und $\alpha 1$ -CB6B ausgegangen werden. Unter der Voraussetzung einer weitgehenden Homologie zur Sequenz des Kalbskollagens, sollte eine Fragmentierung der genannten Kaninchenkollagenpeptide und Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung ausreichende Information zur Aufstellung einer vorläufigen Sequenz erlauben.

Die durch weiteren Abbau erhaltenen Peptide, die dem C-terminalen Teil der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens zugeordnet werden können, sind in Abb. 16, S. 35 dargestellt. Ihre Aminosäurezusammensetzung zeigt Tabelle 5, S. 36.

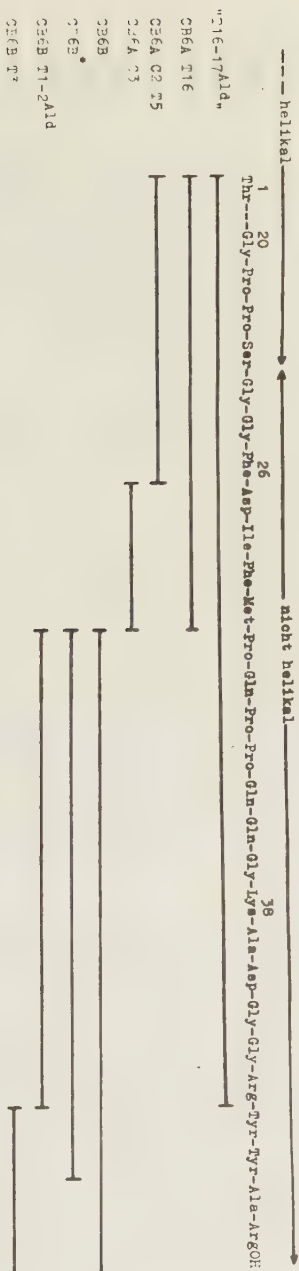


Abb. 16: Vorläufige Sequenz des nicht helikalen carboxyterminalen Bereichs der α 1-Kette des Kaninchens und Lage der charakterisierten terminalen Peptide.

	CB6A C1	CB6A C2	"P16-17 ^{Ald} "	CB6A P16	CB6B	CB6B*	CB6B ^{Ald} P1-2	CB6B ^{Ald} P3	CB6A C2-P5	CB6A C3
3-Hyp	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Hyp	7,1	8,5	3,8	3,6	-	-	-	-	3,6	-
Asp	5,5	3,3	3,1	2,3	1,0	1,0	1,0	-	1,4	1,1
Thr	3,1	1,1	1,0	0,9	-	-	-	-	0,9	-
Ser	3,8	3,9	1,0	1,0	-	-	-	-	1,0	-
Hse	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	1,0
Glu	10	3,5	3,4	1,0	3,1	3,1	3,2	-	-	-
Pro	17,3	15,1	9,9	7,1	3,1	3,0	3,1	-	6,6	-
Gly	36	31	12	8,4	3,4	3,4	3,0	0,4	10	-
Ala	14	6,0	2,0	1,3	2,0	1,2	1,0	1,0	1,0	-
Val	1,5	1,1	1,1	1,0	-	-	-	-	0,8	-
Met	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-
Ile	2,3	1,1	1,0	0,9	-	-	-	-	-	0,9
Leu	1,2	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	-	-	1,8	1,5	-	1,8	-	-
Phe	0,5	1,0	2,4	1,7	-	-	-	-	1,0	1,0
Hyl	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
His	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lys	2,3	1,2	-	-	0,8	0,6	-	-	-	-
Arg	8,1	3,3	0,9	-	1,9	1,2	0,9	1,0	-	-
Summe	113	83	43	30	17	15	12	4	26	4

Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung der C-terminalen Peptide der α1-Kette des Kaninchens.

Fragmente des α 1-CB6A.

Die Kurzzeitspaltung (40 Min.) von α 1-CB6A mit α -Chymotrypsin führte zu vier Peptiden. Das Gemisch ließ sich an Biogel P-4 in zwei Hauptkomponenten trennen. Die im Ausschluß laufende Komponente konnte an Biogel P-150 in zwei Peptide von 113 bzw. 83 Aminosäuren, mit α 1-CB6A C1 und α 1-CB6A C2 bezeichnet, getrennt werden. Sie können ihrer Größe und Aminosäurezusammensetzung nach als homolog zum Kalb angesehen werden (Tabelle 5, S. 36) (5). Die im Salzbereich erscheinenden Komponenten wurden mittels Hochspannungs-PapierELEKTROPHORESE präparativ aufgetrennt. Das zur Aufspaltung des Homoserinlactons zuvor mit Piperidin behandelte Gemisch trennte sich in ein basisches Peptid, Arg-Gly-Phe, einem Nebenspaltprodukt des α 1-CB6A C1 (3) und eine saure Komponente. Dieses Peptid enthält 4 Aminosäuren, Asp, Ile, Phe, Hse, und ist wegen des Homoserins als carboxyterminales Peptid α 1-CB6A C3 anzusehen. Durch Dansylierung wurde Asparaginsäure als N-terminale Aminosäure nachgewiesen. In Übereinstimmung damit ergab die Bestimmung der carboxylständigen Aminosäuren des α 1-CB6A mit CPA die Aminosäuren Ile, Phe und Hse in äquimolarem Verhältnis. Abbau von α 1-CB6A C2 ergab einzig Phenylalanin.

C-terminales tryptisches Peptid des α 1-CB6A C2.

Spaltung des α 1-CB6A C2 mit Trypsin und Auftrennung an Phosphorcellulose nach Wendt et al. (22) ergab ein Peptidmuster, das der am Kalb ausgeführten Trennung entsprach. Das C-terminale Peptid T16(1-26) hat wie das beim Kalb beschriebene 26 Aminosäuren, weist aber nach der Aminosäureanalyse gegenüber dem Kalb den im helikalen Teil liegenden Austausch Ala $\rightarrow$ Val auf, sowie den durch CPB-Abbau vermuteten Austausch Tyr $\rightarrow$ Phe am Carboxylende.

Fragmente des $\alpha 1$ -CB6B^{Ald}.

Das nach der Spaltung des $\alpha 1$ -CB6B^{Ald} mit Trypsin erhaltene Gemisch wurde an Biogel P-2 (200/400 mesh) aufgetrennt. Die Zusammensetzung des großen Peptids $\alpha 1$ -CB6B T1-2^{Ald} ist in Tabelle 5, S.36 aufgeführt. Im Salzpeak wurde nach Hydrolyse ein Peptid von 4 Aminosäuren, $\alpha 1$ -CB6B T3, erhalten. Im Parallelversuch ohne Hydrolyse waren in diesem Material keine freien Aminosäuren nachzuweisen. Dies schließt vorerst jedoch nicht aus, daß ein Gemisch zweier Dipeptide vorlag. Spaltversuch mit CPB an diesem Tetrapeptid ergaben nach 6stündiger Inkubation Arginin und Alanin im Verhältnis 1:1, das vermutliche Restpeptid Tyr-Tyr wurde von CPB nicht angegriffen. Die Entscheidung ob Ala oder Arg C-terminal steht, kann nicht eindeutig getroffen werden. Eine partielle Spaltung der Bindung Arg-Ala durch Trypsin ist denkbar; ein Beispiel für die glatte Spaltung der Bindung Arg-TyrOH bietet das $\alpha 1$ -CB6^a vom Kalb (s.S.26).

Vergleichende Trypsinspaltung von $\alpha 1$ -CB6B und $\alpha 1$ -CB6B*.

Trypsinspaltung von $\alpha 1$ -CB6B und dem um 2 Aminosäuren kürzeren $\alpha 1$ -CB6B* unter identischen Bedingungen und Vergleich der Chromatogramme nach der Trennung an Biogel P-2, erbrachte einen markanten Unterschied. Aus Abb. 17, S.39 geht hervor, daß der Unterschied beim $\alpha 1$ -CB6B* in einem nach dem Salzpeak laufenden stark retardierten Peak besteht, der durch Aminosäureanalyse und dünnschichtchromatographisch als Tyr-Tyr identifiziert wurde, welches bei der $\alpha 1$ -Kette vom Kalb die C-terminale Sequenz darstellt. Der Salzpeak von $\alpha 1$ -CB6B (Abb. 17 A) enthält dagegen das schon bekannte Tetrapeptid $\alpha 1$ -CB6B T3, während im Salzpeak von $\alpha 1$ -CB6B* (Abb. 17 B) nur geringfügige Mengen freier Aminosäuren gefunden wurden. Da sich beide Ausgangspeptide nur durch

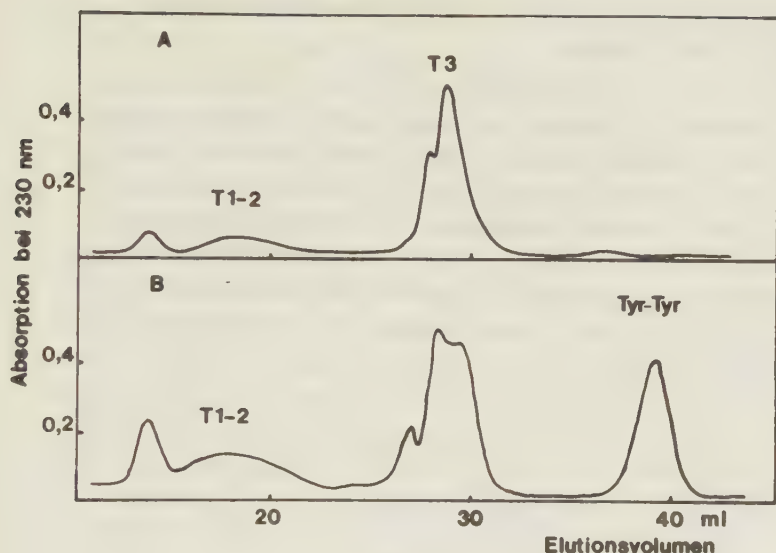


Abb. 17: Auftrennung der tryptischen Peptide von $\alpha 1$ -CB6B (A) und $\alpha 1$ -CB6B^{*} (B) an Biogel P-2. Elution mit 0,1 M Essigsäure.

das Fehlen eines Arginins und eines Alanins beim $\alpha 1$ -CB6B unterschieden, muß angenommen werden, daß in $\alpha 1$ -CB6B diese beiden Aminosäuren endständig sind und $\alpha 1$ -CB6B^{*} mit der Sequenz Tyr-TyrOH endet.

Die Untersuchung der bei beiden Spaltungen als breiter flacher Peak erscheinenden Fraktionen (Abb.17 A+B) ergab Identität ihrer Aminosäurezusammensetzung. Diese entspricht einem Peptid $\alpha 1$ -CB6B T1-2, das sich von $\alpha 1$ -CB6B T1-2^{Ald} durch einen zusätzlichen Lysinrest unterscheidet. Es konnte nicht entschieden werden, ob ein ungespaltenes Peptid vorlag oder keine Separierung von $\alpha 1$ -CB6B T1 und -T2 erzielt werden konnte. Durch Hochspannungs-Papierelektrophorese war ebenfalls keine Separierung zu erreichen.

Isolierung eines $\alpha 1$ -CB6A und $\alpha 1$ -CB6B überlappenden tryptischen Peptids.

Dieses Überlappungspeptid kann aus dem tryptischen Abbaugemisch der gesamten $\alpha 1$ -Kette nicht lathyritischer Kaninchen isoliert werden. Die $\alpha 1$ -Kette besitzt nur noch im $\alpha 1$ -CB3 ein tryptisches Peptid vergleichbarer Länge (26), das bei Chromatographie an Sephadex G-50 an derselben Position erscheint. Phosphorcellulose-Chromatographie bei pH 3,6 über einen konkaven Gradienten von 0 bis 0,3 M NaCl trennt die Peptide voneinander (Abb. 18).

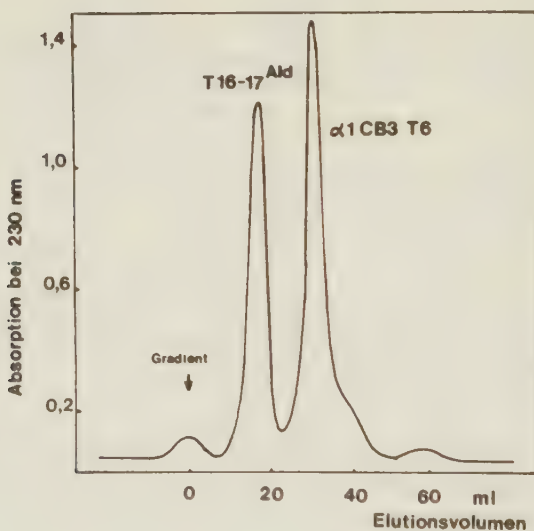


Abb. 18: Phosphorcellulose-Chromatographie tryptischer Peptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens. Eingesetzt war die nach Sephadex G-50-Chromatographie erhaltene Fraktion vom Molekulargewicht 4500. Elutionsbedingungen: 1/1000 M Natriumacetat pH 3,6, konkaver Gradient 100/100 ml von 0-0,3 M NaCl.

Das Peptid enthält Methionin, besitzt einen nicht helikalen Teil und entspricht dem aus $\alpha 1$ -CB6^U (Kalb) isolierten Peptid T16-17^{Ald}. Hinweise für das Auftreten eines $\alpha 1$ -CB6 T16 (Kalb) homologen Peptids ergaben sich nicht. Allerdings wurde das Peptid aus nicht lathyritischer Kaninchenhaut hergestellt, bei der die Lysin-aldehydform überwiegt. Eine Abreicherung der niedermolekularen Komponente durch die zweifache Gelchromatographie muß ebenfalls berücksichtigt werden.

CNBr-Spaltung des methioninhaltigen Peptids und Gelchromatographie an Biogel P-10 lieferte den N-terminalen Teil des Peptids von 30 Aminosäuren. Seine Aminosäurezusammensetzung entspricht der Summe der Peptide $\alpha 1$ -CB6A C2 T5 und $\alpha 1$ -CB6A C3. Das zugehörige C-terminale Peptid, das die Zusammensetzung eines $\alpha 1$ -CB6B T1-2^{Ald} haben sollte, konnte jedoch nicht isoliert werden.

3.4. Diskussion.

Die CNBr-Peptide des Kaninchens wurden unter dem Aspekt der Immunologie des Kollagens in Bearbeitung genommen. Von Bornstein und Nesse (41) wurden drei CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens beschrieben, $\alpha 1$ -CB1, $\alpha 1$ -CB2 und $\alpha 1$ -CB3. Die vollständige Kenntnis wurde anhand dieser Untersuchungen vermittelt.

Entsprechend der in der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens gefundenen 9 Methioninreste können 10 CNBr-Peptide isoliert und charakterisiert werden. Die weitgehende Homologie der Peptide zu denen von Ratte und Kalb erlaubt ihre Zuordnung innerhalb der Kette. Sie ist in Abb. 19, S.42 dargestellt.

Die Peptide aus dem mittleren helikalen Bereich der Kette weisen große Ähnlichkeit mit entsprechenden Peptiden der

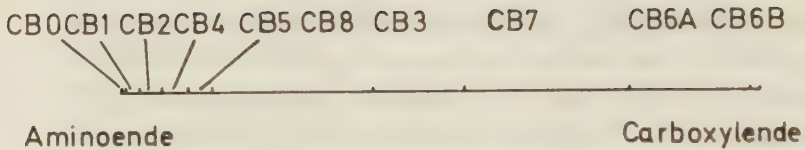


Abb. 19: Anordnung der CNBr-Peptide der α_1 -Kette des Kaninchenkollagens.

Ratte und des Kalbs auf. Bei den großen Peptiden lassen die im Vergleich zu Ratte und Kalb gefundenen Unterschiede keine Aussage über Aminosäureaustausche zu. Ihre Zahl dürfte jedoch gering sein. Bei den kleinen Peptiden α_1 -CB2, α_1 -CB4 und α_1 -CB5 können Austausche festgestellt werden. Diese sind im Vergleich zu Ratte und Kalb in Tabelle 6 aufgeführt.

Spezies	α_1 -CB2	α_1 -CB4	α_1 -CB5
Kaninchen	Ser	Ala	Ala
Ratte	Ala	Pro	Thr
Kalb	Ala	Pro	Ala

Tab. 6: Aminosäuresubstitutionen verschiedener Spezies in kleinen CNBr-Peptiden der helikalen Region.

Größere Unterschiede bestehen in den nicht helikalen terminalen Bereichen. So wurde beim Kaninchen N-terminal ein α_1 -CB0 (Glx-Hse) gefunden, wie es bisher nur in Rattensehne, neuerdings auch Haut (27) und im Huhn (28) festgestellt wurde. Beim Kalb ist dieser Methioninrest durch Leu ersetzt und gibt Anlaß zu einem Peptid α_1 -CB0.1 von 19 Aminosäuren. Die entsprechende Sequenz des Kaninchens dürfte gegenüber diesem Peptid drei Austausche aufweisen und identisch mit dem Ratten-

peptid sein.

Die markantesten Unterschiede sind im C-terminalen Bereich zu finden. Es wurde beim Kaninchen erneut gezeigt, daß $\alpha 1$ -Ketten des Kollagens C-terminal eine nicht helikale Sequenz besitzen. Beispiele hierfür existieren im Kalbskollagen (5) und Rattenkollagen (27). Diese Sequenz enthält beim Kaninchen einen Methioninrest, wodurch ein zehntes CNBr-Peptid, $\alpha 1$ -CB6B entsteht. Der in $\alpha 1$ -CB6B enthaltene Lysinrest kann zu Lysinaldehyd oxydiert werden. Da diese für die Ausbildung von Quervernetzungen essentiell sind, kann hierin ein allgemeines Strukturprinzip des Kollagens gesehen werden.

Neben $\alpha 1$ -CB6B wird noch ein weiteres Peptid, $\alpha 1$ -CB6B* gefunden. Durch Fragmentierungsstudien wurde gezeigt, daß dieses Peptid ein um 2 Aminosäuren kürzeres Degradierungsprodukt von $\alpha 1$ -CB6B darstellt. Bei der Darstellung der CNBr-Peptide aus $\alpha 1$ -Ketten, die von neu-tralsalzlöslichem Kollagen gewonnen worden waren, konnte überhaupt kein $\alpha 1$ -CB6B gefunden werden. Das $\alpha 1$ -CB6A entsprechende Peptid enthielt kein Homoserin, sondern endete C-terminal mit Phenylalanin. Diese Labilität der carboxyterminalen Sequenzen entspricht den bereits an Kalbskollagen festgestellten Ergebnissen (s. Kap. 2.5.) und tritt auch beim Kollagen der Ratte und des Menschen (27,23) auf. Sie ist bei den entsprechenden N-terminalen Sequenzen in deutlich geringerem Maße zu beobachten (29). Es ist denkbar, daß die Empfindlichkeit dieser Sequenzen gegenüber Proteolyse Ausdruck ihrer biologischen Funktion ist. Abbau und Umbau von Kollagen bei normalem Stoffwechsel oder bei der Wundheilung könnte durch Abspaltung dieser Sequenz und damit Auflösung der Quervernetzung in diesem Bereich eingeleitet werden.

Die Untersuchungen zur Ermittlung der Sequenz des C-terminalen nicht helikalen Bereichs wurden nicht abgeschlossen. Auf der Basis der bekannten Sequenz vom Kalb läßt sich aber eine vorläufige Sequenz aufstellen. In Abb. 20 sind beide Sequenzbereiche gegenüber gestellt.

Kalb	...Gly-Gly-Tyr ²⁶ -Asp-Leu-Ser-Phe-Leu-Pro-Gln-
Kaninchen	...Gly-Gly-Phe-Asp-Ile-----Phe-Met-Pro-Gln-
	34
Kalb	Pro-Pro-Gln-Gln-Glx-Lys-Ala-His-Asp-Gly-
Kaninchen	Pro-Pro-Gln-Gln-Gly-Lys-Ala-----Asp-Gly-
	44
Kalb	Gly-Arg-Tyr-TyrOH
Kaninchen	Gly-Arg-Tyr-Tyr-Ala-ArgOH

Abb.20: Vergleich der Sequenz des carboxy-terminalen Bereichs der $\alpha 1$ -Kette von Kalbskollagen mit der homologen vorläufigen Sequenz des Kaninchenkollagens. ---: Deletion.

Die noch unsicheren Positionen sind für die Sequenzvergleiche der antigenen Determinanten nicht von Bedeutung. Eine Substitution konnte nicht zugeordnet werden. Die Möglichkeit, daß Deletion eines Gln in Position 33 bzw. 36-38 eingetreten ist und damit His durch Gly beim Kaninchen ersetzt ist, kann nicht von der zweiten Möglichkeit unterschieden werden, Deletion des His in Position 41 und gleichzeitig Austausch eines Gln bzw. Glx gegen Gly. Für den Fall, daß es sich bei Glx in Position 38 um eine Glutaminsäure handelt, erscheint der Austausch gegen Gly am wahrscheinlichsten, weil einzig diese Möglichkeit einen Einbasenaustausch darstellt. Die Entscheidung mittels Trypsinspaltung des $\alpha 1$ -CB6B am Lysin und Isolierung der Spaltstücke gelang nicht. Es konnte

nicht festgestellt werden, ob die Spaltstelle trypsinresistent ist oder ob keine Separierung in der Hochspannungs-Papierelektrophorese erzielt wurde.

Ein Teil des $\alpha 1$ -CB6B wird in einer verkürzten Form, endend mit Tyr-TyrOH gefunden. Dieses Carboxylende wird bisher beim Kalb als die intakte Struktur der $\alpha 1$ -Kette angesehen. Durch den Nachweis einer noch um zwei Aminosäure reste längeren Sequenz beim Kaninchen erscheint aber auch beim Kalb die Existenz einer noch längeren Sequenz möglich.

Im Vergleich zum Kalb treten zwei Deletionen auf, wovon sich die eine sicher vor dem Lysin befindet und die andere möglicherweise ebenfalls. Obwohl die Gesamtlänge der Kette durch die zwei zusätzlichen Aminosäurereste Alanin und Arginin dieselbe bleibt, ist damit Lysin um ein bis zwei Plätze verschoben. Es erhebt sich die Frage, ob die Verschiebung Konsequenzen für die Ausbildung der Quervernetzung der Kollagenmoleküle hat.

4. Untersuchungen zur Struktur der antigenen Determinanten des $\alpha 1$ -CB6 vom Kalb.

Die nach Immunisierung von Kaninchen erzielten Antikörperkonzentrationen im Serum liegen bei 100 bis 400 $\mu\text{g/ml}$ (30) und sind damit um ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als vergleichbare Antikörperkonzentrationen gegen potente Proteinantigene. Zum Nachweis der Kollagenantikörper muß daher eine genügend empfindliche Methode eingesetzt werden. Als diese eignet sich die von Steffen et al. (31) für das Kollagensystem modifizierte Methode der passiven Hämagglutination nach Stavitsky (32).

50 Kaninchenantisera wurden mittels dieser Methode untersucht und klassifiziert. Sie besitzen allgemein starke Aktivität für C-terminale Bereiche, jedoch auch Antikörper, die gegen antigene Determinanten (AD) des Mittelbereichs gerichtet sind (33). Diese zeigen verglichen mit der gegen C-terminale Bereiche gerichteten Aktivität nur geringe Titer. Dennoch müssen zur Untersuchung der C-terminalen Determinanten die Antikörper gegen zentrale Bereiche abgetrennt werden. Dies geschieht durch Immunadsorption an einem mit denaturiertem Kaninchenkollagen beladenen Adsorbens, das die mit Kaninchenkollagen kreuzreagierenden Antikörper gegen zentrale AD abtrennen kann (33). In den folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich Antikörperlösungen verwendet, die sich nicht an ein derartiges Adsorbens binden und demzufolge in ihrer Spezifität eingeengt sind.

4.1. Charakterisierung der Antiseren nach dem Verhalten in der Agglutination.

Die Antiseren wurden im Agglutinationstest untersucht. Dazu wurden alle beschriebenen $\alpha 1$ -CB6-Fragmente und das carboxyterminale CNEP-Peptid der $\alpha 2$ -Kette, $\alpha 2$ -CB2, 2, verwendet.

Beladung der Erythrozyten eingesetzt. Da serologisch weder im Agglutinations- noch Inhibitionstest ein Unterschied zwischen $\alpha 1\text{-CB6}^a$ und $\alpha 1\text{-CB6}^U$ feststellbar war, wird im folgenden nur jeweils eine Form aufgeführt. Entsprechend ihrem Reaktionsbild konnten so die Antiseren in 3 Gruppen klassifiziert werden. Tabelle 7 enthält die Agglutinationstiter von je 2 für die jeweilige Gruppe charakteristischen Antiseren.

Gruppe	Serum Nr.	$\alpha 1\text{-CB6}^{a/U}$	$\alpha 1\text{-CB6}^b$	$\alpha 1\text{-CB6}^{Chy}$	$\alpha 2\text{-CB3.5}$
I	174	512	<2	<2	512
	266	256	4	<2	4
II	137	<2	256	<2	<2
	261	<2	64	<2	<2
III	236	4096	4096	<2	256
	270	512	256	<2	4

Tabelle 7: Repräsentative reziproke Agglutinationstiter gegen Kalbskollagen mit C-terminalen CNBr-Peptiden.

Seren der Gruppe I reagieren ausschließlich mit $\alpha 1\text{-CB6}^a$, $\alpha 1\text{-CB6}^b$ und $\alpha 1\text{-CB6}^{Chy}$ sind inaktiv. Seren dieser Gruppe wurden als a-spezifisch bezeichnet.

Seren der Gruppe II reagieren mit $\alpha 1\text{-CB6}^b$, aber weder mit $\alpha 1\text{-CB6}^a$ noch $\alpha 1\text{-CB6}^{Chy}$. Diese Gruppe von Antiseren wurde als b-spezifisch bezeichnet.

Zur Gruppe III wurden alle Antiseren gerechnet, die sowohl mit $\alpha 1\text{-CB6}^a$ als auch mit $\alpha 1\text{-CB6}^b$ Agglutination zeigen, jedoch nicht mit $\alpha 1\text{-CB6}^{Chy}$ reagieren. Es mögen dies Seren mit einer gemischten Population von Antikörpern sein, oder aber mit einer eigenen neuen Spezifität.

In allen drei Gruppen sind einzelne Antiseren vertreten, die einen Agglutinationstiter mit $\alpha 2$ -CB3.5 zeigen. Aus der folgenden Beschreibung der Inhibitionsteste geht jedoch hervor, daß hier keine Kreuzreaktion von $\alpha 2$ -CB3.5 mit $\alpha 1$ -CB6 vorliegt, sondern daß die Antiseren zusätzlich Antikörper gegen distinkte AD auf diesem Peptid enthalten.

Die Häufigkeit, mit der Antikörper einer bestimmten Spezifität in den untersuchten Antiseren auftraten, ist in Tabelle 8 gezeigt. Es geht daraus hervor, daß ursprünglich außer gegen terminale Bereiche auch Antikörper gegen zentrale Bereiche vorhanden waren. Diese wurden aber durch Immunadsorption abgetrennt. In geringem Umfang werden auch gegen N-terminale Strukturen Antikörper gebildet. Über Untersuchungen der gegen zentrale und N-terminale Strukturen gerichteten Antikörper siehe (33) und (35).

	Spezifität für	Häufigkeit
C-terminale Bereiche	$\alpha 1$ -CB6 ^a	39
	$\alpha 1$ -CB6 ^b	15
	$\alpha 1$ -CB6 ^a + $\alpha 1$ -CB6 ^b	27
	$\alpha 2$ -CB3.5	28
	nicht festgestellt	11
N-terminale Bereiche*	$\alpha 1$ -CB0.1	4
Zentrale Bereiche**	$\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Kette	95

Tabelle 8: Häufigkeit von Antikörpern bestimmter Spezifität in 52 Antiseren gegen säurelösliches Kalbskollagen.

**siehe (35)
siehe (33)

4.2. Charakterisierung der Antisera im Inhibitionstest.

Die Spezifität der Reaktion der Gruppen I und II wurde durch Inhibitionstest festgestellt. Die Antisera wurden vor Zusatz der Erythrozyten mit dem Inhibitor inkubiert. In Abb. 21 ist die mittlere Titerreduktion von 4 bis 6 individuellen Antisera aufgetragen.

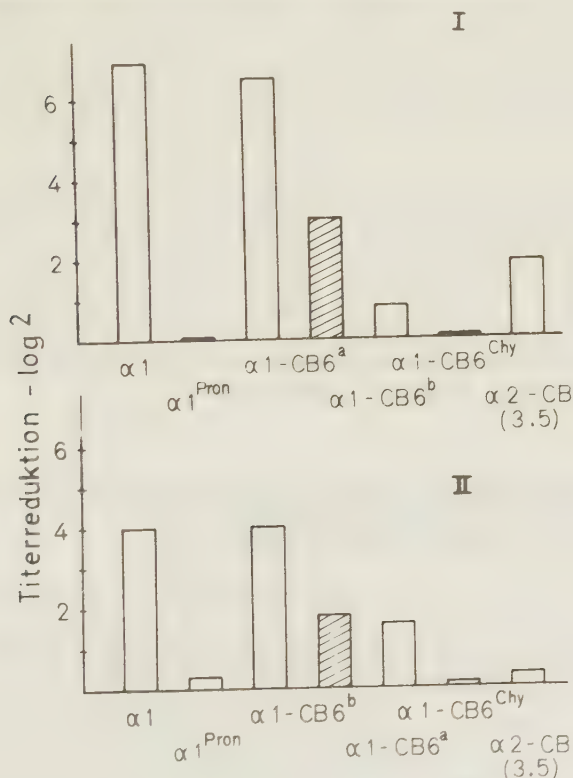


Abb. 21: Hämagglutinations-Inhibitionstest mit $\alpha 1$ -Ketten, $\alpha 1$ -Ketten aus Pronase-behandeltem SLK und carboxyterminalen CNBr-Peptiden der $\alpha 1$ - und der $\alpha 2$ -Kette.

I: Antikalkbiskollagensera der Gruppe I (Tab.8); Erythrozyten beladen mit $\alpha 1-CB6^a$.

II: Antisera der Gruppe II, Erythrozyten beladen mit $\alpha 1-CB6^b$.

Mittelwerte aus 4-6 individuellen Antisera. Inhibitorkonzentration $10 \mu\text{mol/l}$, für die schraffierten Flächen $1 \mu\text{mol/l}$.

Die Höhe der Balken ist ein Maß für die serologische Aktivität. Als Inhibitoren wurden alle $\alpha 1$ -CB6-Peptide, sowie $\alpha 2$ -CB3.5 eingesetzt und die Reaktion mit $\alpha 1$ -Ketten aus SLK und Pronase-vorbehandeltem SLK verglichen.

Der Vergleich von $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ auf einer molaren Basis zeigt gleiche und starke Inhibitionsaktivität (Titerreduktion von mehr als $6 \log^2$ -Einheiten). Keine oder merklich reduzierte Aktivität findet sich bei $\alpha 1$ -CB6^b und $\alpha 2$ -CB3.5. $\alpha 1$ -Ketten bzw. $\alpha 1$ -CB6 aus proteolytisch vorbehandeltem Kollagen ($\alpha 1^{\text{Pron}}$, $\alpha 1$ -CB6^{Chy}) sind inaktiv und demonstrieren damit die von Pontz et al. (15) beschriebene Proteaselabilität dieser Determinante.

Bei der Inhibition der Antiseren der Gruppe II (b-spezifische Antiseren) zeigt nur $\alpha 1$ -CB6^b eine mit $\alpha 1$ -Ketten vergleichbare Inhibitionsaktivität. $\alpha 1$ -CB6^a reagiert schwächer als eine 10fach verdünnte Inhibitorlösung von $\alpha 1$ -CB6^b. Inaktiv sind $\alpha 1^{\text{Pron}}$, $\alpha 1$ -CB6^{Chy} und $\alpha 2$ -CB3.5. Für alle folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich Seren der Gruppe I und II verwendet.

4.3. Beziehung zwischen Mikroheterogenität des $\alpha 1$ -CB6 und serologischer Aktivität.

Es wurde getestet, ob die chromatographisch erkennbare Mikroheterogenität des $\alpha 1$ -CB6 (s.S. 14) Anlaß zu einer ebensolchen serologischen Heterogenität gibt. In Abb. 5 S. 15 ist die Inhibitionsaktivität der Subfraktionen von $\alpha 1$ -CB6^a zusätzlich eingetragen. In Übereinstimmung mit chemischen Untersuchungsmethoden kann kein differentes Verhalten festgestellt werden. Ein ähnliches, nicht gezeigtes Bild, ergibt sich für die serologische Aktivität der Subfraktionen von $\alpha 1$ -CB6^b.

4.4. Serologische Aktivität von $\alpha 1$ -CB6 nach Abbau mit Proteasen.

Abb. 22 zeigt das Ergebnis im Inhibitionstest nach enzymatischem Abbau von $\alpha 1$ -CB6^a bzw. -^b mit Trypsin, α -Chymotrypsin und Kollagenase.

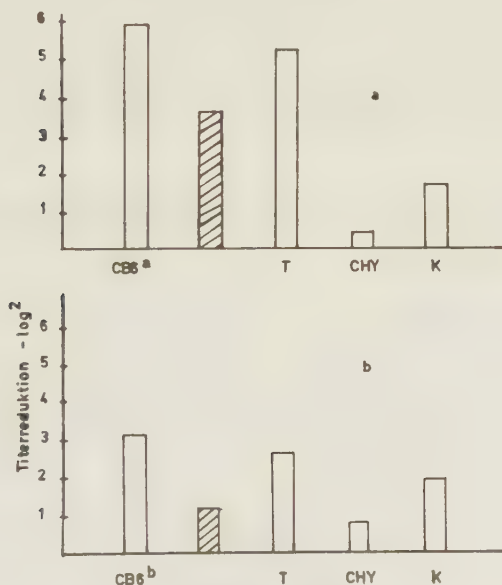


Abb. 22: Hämagglutinations-Inhibitionstest mit proteolytischen Abbaugemischen von $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ -CB6^b.
a: Antiseren der Gruppe I/ Erythrozyten beladen mit $\alpha 1$ -CB6^a.
b: Antiseren der Gruppe II/ Erythrozyten beladen mit $\alpha 1$ -CB6^b.
Inhibitorkonzentration 10 μ mol/l bzw. 1 μ mol/l für schraffierte Balken.
T: Trypsin, CHY: α -Chymotrypsin, K: Kollagenase.

Nach Trypsinbehandlung wird die volle Aktivität des Ausgangs-peptids wiedergefunden, während sie nach Chymotrypsinabbau zerstört und nach Kollagenaseabbau partiell

reduziert wird. Es wurde daher für präparative Ansätze Trypsin eingesetzt, das zur Inaktivierung eventueller chymotryptischer Aktivität mit TPCK (36) vorbehandelt war.

Die Inhibitionsmethode wurde auch für das Aufsuchen serologisch aktiver Peptide in Einzelfractionen von präparativ getrennten Abbaugemischen aus $\alpha 1$ -CB6 eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist bereits früher in Abb. 7 S. 18 gebracht worden. Die serologische Aktivität der Fractionen wurde dabei mit der Aktivität des nicht separierten Ausgangsgemisches verglichen.

4.5. Immunologische Aktivität von definierten Peptiden des $\alpha 1$ -CB6.

Die Inhibitionsteste mit $\alpha 1$ -^{Pron} und $\alpha 1$ -CB6^{Chy} wie auch frühere Versuche (15) hatten darauf hingewiesen, daß die AD im C-terminalen Bereich des $\alpha 1$ -CB6 lokalisiert sein sollte. Die nach Fractionierung an Dowex (Abb.7,S.18) und Biogel P-10 (Abb.8,S.20) erhaltenen serologisch aktiven Fractionen tryptischer Abbaugemische enthielten in erster Linie Peptide, die vom Carboxylende stammen. Es wurden daher weitere Fragmentierungsprodukte im Inhibitionsversuch getestet. In Abb. 23,S.53 ist die mittlere Inhibitionsaktivität der getesteten Peptide als Mittelwert von Testen mit 3 bis 8 individuellen Antiseren dargestellt.

Im a-spezifischen System (Seren der Gruppe I) erreicht T16-17^{Ald} und T16, sowie das aus T16 dargestellte Kollagenasepeptid die Aktivität des Ausgangsmaterials $\alpha 1$ -CB6^a auf molarer Basis, während die übrigen mehr oder weniger inaktiv sind.

Im b-spezifischen System (Seren der Gruppe II) zeigt nur T16(1-28) eine starke Aktivität. Alle Peptide die aus demselben Sequenzbereich stammen, jedoch größer als T16(1-28) sind, erweisen sich als inaktiv.

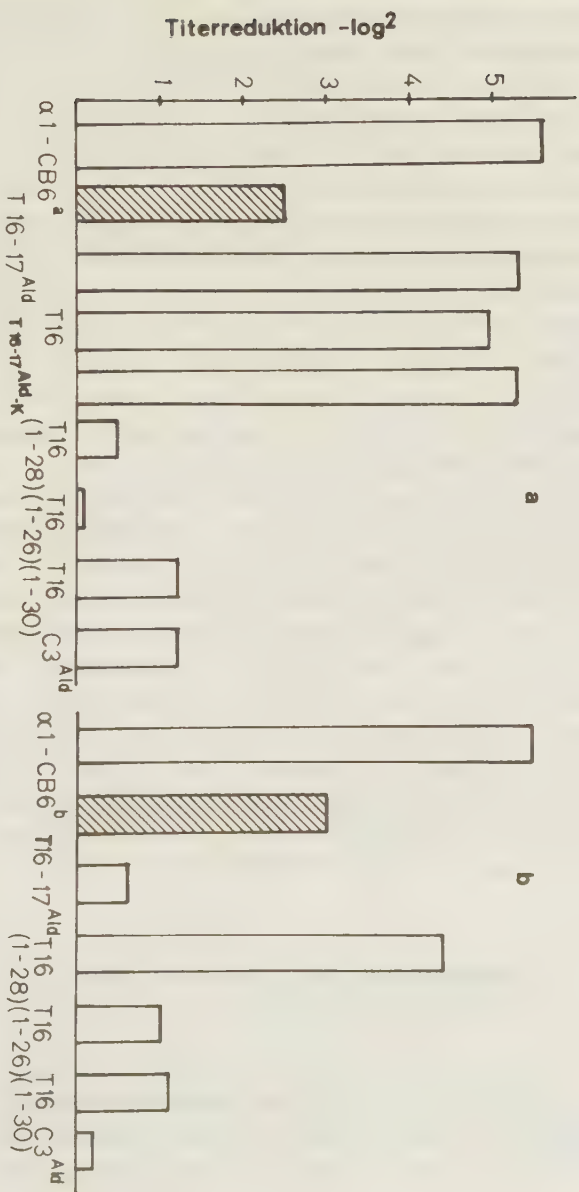


Abb. 23: Hämeagglutinations-Inhibitionstest mit carboxyterminalen Peptiden von α1-CB6^a und α1-CB6^b. Mittelwerte aus 3-8 individuellen Antiseren der Gruppe I und II.

a: Erythrozyten beladen mit α1-CB6^a.
b: Erythrozyten beladen mit α1-CB6^b.

Inhibitorkonzentrationen 10 μmol/l, für die schraffierten Flächen 1 μmol/l.

Die serologische Aktivität der Peptide ist unabhängig vom Ursprung des Ausgangsmaterials. T16(1-28) aus $\alpha 1\text{-CB6}^b$ dargestellt, hat dieselbe b-Aktivität wie T16(1-28) aus $\alpha 1\text{-CB6}^a$. Präparate von T16-17^{Ald}, dargestellt aus $\alpha 1\text{-CB6}^a$ oder $\alpha 1\text{-CB6}^U$ waren ebenfalls serologisch ununterscheidbar. Das aus T16(1-28) aus Kollagenase-Abbau dargestellte 9 Aminosäuren lange Peptid T16(20-28) wurde mangels größerer verfügbarer Mengen nur mit zwei Antiseren getestet. Das eine Antiserum war gegenüber diesem Peptid vergleichbar aktiv wie das Ausgangspeptid T16(1-28). Das andere Antiserum dagegen zeigte gegenüber dem Kollagenasepeptid eine stark reduzierte Aktivität.

Obwohl sich gezeigt hatte, daß Chymotrypsin die serologische Aktivität zerstört, wurden Inhibitionen mit definierten chymotryptischen Peptiden wiederholt, da sie für die Lokalisierung der AD von Wichtigkeit waren. $\alpha 1\text{-CB6}^a$ wird mit Chymotrypsin in drei Peptide (C1-3) gespalten (5). C1 und C2 sind in $\alpha 1\text{-CB6}^{\text{Chy}}$ enthalten, das inaktiv gefunden wurde. Die Spaltstelle C1/C2 ist also für die AD nicht von Wichtigkeit, was mit dem an tryptischen Peptiden erzielten Ergebnis übereinstimmt. Dagegen erwies sich die Spaltstelle C2/C3 als wichtig, denn C3, obwohl es den größten Teil der nicht helikalen Sequenz repräsentiert, ist ebenfalls nur gering aktiv. (Abb.23, S. 53). T16(1-26), das durch Chymotrypsinspaltung des b-aktiven T16(1-28) entsteht, wird durch den Verlust der Sequenz Asp-IeuOH inaktiv.

4.6. Kreuzreaktion von a spezifischen Antikörpern mit $\alpha 1\text{-CB6}$ anderer Spezies.

Es wurden Kreuzreaktionen der Anti-Kalbseren mit $\alpha 1\text{-CB6}$ von Ratte, Mensch und Kaninchen durchgeführt. Die Untersuchung von Kreuzreaktionen auf $\alpha 1\text{-CB6}$ -Basis ist nur sinnvoll, wenn in den untersuchten Präparaten die kom-

plette nicht helikale Sequenz vorliegt. $\alpha 1$ -CB6 dieser Spezies war aus $\alpha 1$ -Ketten isoliert, die unter denaturierenden Bedingungen gewonnen worden waren. Der Nachweis ihrer kompletten nicht helikalen Sequenz war gegeben (27,23). Im Fall des Kaninchens kann nur die ganze $\alpha 1$ -Kette für serologische Tests eingesetzt werden, weil im Bereich der Sequenz der Determinante ein Methioninrest vorhanden ist und die Spaltung mit CNBr die Reaktion beeinflussen kann. Als Testseren dienten 13 α -spezifische Seren der Gruppe I (Tab. 9). Im Agglutinationstest reagierten davon 8 sowohl mit Ratten- als auch Human- $\alpha 1$ -CB6. Zwei weitere Seren reagierten nur noch deutlich mit Ratte und 3 Seren zeigten strenge Spezies-Spezifität.

Gruppe/ Antiserum Nr.	Zahl der Antiseren	Reziproker Titer für			
		$\alpha 1$ -CB6 ^U Kalb	$\alpha 1$ -CB6 ^U Ratte	$\alpha 1$ -CB6 ^U Mensch	$\alpha 1$ - Kan.
1 /272	8	4096	2048	2048	<4
2 /334	2	4096	1024	16	<4
3 /332	3	512	16	4	<4

Tab. 9: Kreuzreaktion von Anti-Kalbskollagenseren mit $\alpha 1$ -CB6^U verschiedener Spezies. Angegeben ist der reziproke Titer je eines ausgewählten Antiserums aus Gruppe 1-3.

Erwartungsgemäß reagierte keines der Antiseren mit der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens.

Die Spezifität der Agglutinationsreaktion wurde durch Inhibitionsteste untersucht. Getestet wurden die 8 Antiseren der Gruppe 1 aus Tab. 9 und die 3 Antiseren der Gruppe 3. Die Erythrozyten waren jeweils mit $\alpha 1$ -CB6 (Kalb) beladen. Das Ergebnis ist in Abb. 24 dargestellt.

Es zeigt sich für alle Antiseren der Gruppe 1, daß die Reaktion mit $\alpha 1$ -CB6 Kalb von $\alpha 1$ -CB6 Ratte und $\alpha 1$ -CB6 Mensch inhibiert werden kann. Jedoch reagiert $\alpha 1$ -CB6 Ratte schwächer als Kalb, $\alpha 1$ -CB6 Mensch wiederum schwächer als Ratte. Die drei Antiseren der Gruppe 3 sind ausschließlich von $\alpha 1$ -CB6 Kalb zu inhibieren, eine Reaktion erfolgt weder mit Ratte noch Mensch. Wie schon in der Agglutination zeigt sich auch in der Inhibition in keinem Fall eine Reaktion mit der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens, so daß die Ergebnisse nicht in die Abbildung aufgenommen wurden.

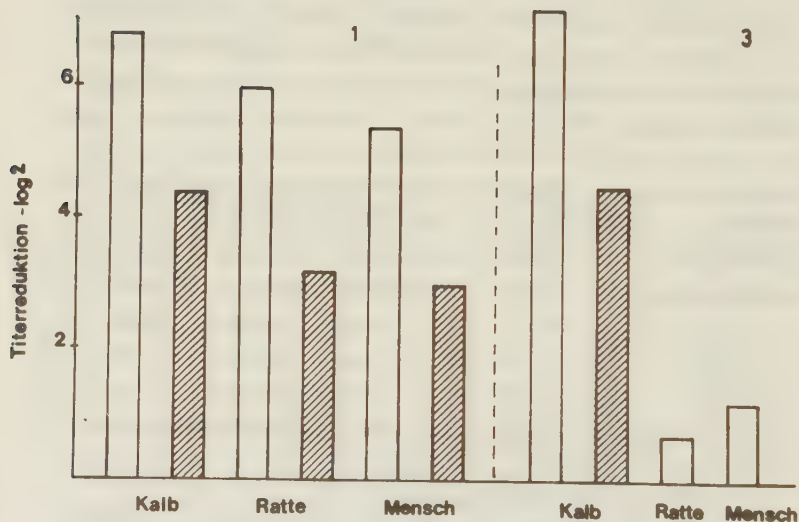


Abb. 24: Hämagglutinations-Inhibitionstest mit $\alpha 1$ -CB6^U verschiedener Spezies. Anti-Kalbskollagenseren mit a Spezifität der Gruppe 1 und der Gruppe 3 aus Tab. 9, S.56. Erythrozyten beladen mit $\alpha 1$ -CB6^U Kalb. Inhibitorkonzentration 10 µmol/l, für schraffierte Flächen 1 µmol/l.

4.7. Diskussion

Es konnten am Carboxylende der $\alpha 1$ -Kette von Kalbskollagen zwei antigene Determinanten charakterisiert werden. Diese werden chemisch durch $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ -CB6^b repräsentiert. Die strukturelle Heterogenität des Carboxylendes der $\alpha 1$ -Kette fand somit Ausdruck in einer entsprechenden serologischen Heterogenität. Die Korrelation zwischen Struktur und antigener Aktivität gelang durch Inhibitionstest mit einander überlappenden carboxyterminalen Peptiden. In Abb.6, S.17 ist die Sequenz des C-terminalen Endes der $\alpha 1$ -Kette und die Position der serologisch getesteten Peptide dargestellt. Die schwarzen Balken bezeichnen die minimale Größe der Determinanten. Die a-Determinante benötigt den Tyrosinrest in Position 26, denn Peptid C3 ist inaktiv. Sie erstreckt sich vom Tyrosin bis mindestens zum Leucin in Position 31, denn T16(1-30), das nur bis zum Phenylalanin reicht, ist ebenfalls inaktiv. Die minimale Sequenz umfaßt somit Tyr-Asp-Leu-Ser-Phe-Leu-. Es kann allerdings nicht geprüft werden, ob die minimale Größe der Determinante für die serologische Aktivität ausreicht. Die mögliche maximale Größe wird C-terminal von T16 begrenzt und N-terminal durch T16-17^{Ald}-K'ase, umfaßt also 21 Aminosäuren. Allerdings ist die Beteiligung der gesamten Sequenz unwahrscheinlich, bisher bekannte Proteindeterminanten sind zwischen 4 und 10 Aminosäuren lang (37,38, 39), was auch an Kollagenpeptiden aus dem N-terminalen Bereich bestätigt wurde (35,55).

Die minimale Größe der b-Determinante umfaßt die Sequenz Tyr-Asp-LeuOH, denn die Abspaltung von Asp - Leu durch α -Chymotrypsin läßt das Gemisch inaktiv werden. Es muß also zumindest noch der Tyrosinrest in Position 26 an der Determinante beteiligt sein. Eine weitere interessante

Schlußfolgerung ergibt sich aus der Tatsache, daß alle Peptide die größer als T16(1-28) sind, eine verminderte Reaktivität aufweisen. Es muß daraus gefolgert werden, daß die freie Carboxylgruppe am Leucinrest in Position 28 Bestandteil der Determinante ist. Die maximale Größe der b-Determinante umfaßt die Sequenz des Nonapeptids T16(20-28).

Das Kollagenmodell hat sich für die strukturelle Aufklärung antigener Determinanten als geeignet erwiesen, wenngleich dies in erster Linie für nicht helikale C- und N-terminale Bereiche gilt. Es kann keine Einbuße an antigener Aktivität festgestellt werden, wenn α 1-Ketten von rund 1000 Aminosäuren mit einem Fragmentierungspeptid von 20-30 Aminosäuren auf molarer Basis verglichen werden. Die Aktivität konformationsabhängiger Determinanten üblicher Proteinantigene sinkt unter denselben Umständen auf wenige Prozent der Ausgangsaktivität (40).

Eine individuelle Heterogenität der Antiseren offenbart sich in der Kreuzreaktion mit homologen Sequenzbereichen anderer Spezies. Die Gegenüberstellung der Partialsequenzen im Bereich der AD von α 1-CB6-Kalb, -Ratte, -Mensch und -Kaninchen (Abb.25) zeigt eine im gleichen Sinne steigende Zahl von Austausch.

Kalb	-Tyr-Asp-Leu-Ser-Phe-Leu-
Ratte*	-Tyr-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-
Mensch*	-Phe-Asp-Phe-Ser-Phe-Leu-
Kaninchen	-Phe-Asp-Ile-...-Phe-Met-

Abb. 25: Vergleich der antigenen Determinante des α 1-CB6-Kalb mit den homologen Sequenzen anderer Spezies.
*wahrscheinliche Sequenz (44,23).

Von 13 getesteten Anti-Kalbskollagenseren reagieren mit Rattenkollagen, bei dem nur der eine Austausch Leu $\rightarrow$ Phe vorkommt, weiterhin 11 Antiseren. Der zusätzliche Tyr $\rightarrow$ Phe-Austausch beim Menschenkollagen läßt die Zahl der kreuzreagierenden Antiseren auf 8 sinken. Neben der reinen Anzahl der Austausche kann auch deren Art für Kreuzreaktionsmuster von Bedeutung sein. Beim Austausch Leu $\rightarrow$ Phe bleibt der hydrophobe Charakter und die Raumerfüllung der Seitenkette etwa gleich. Mit dem Austausch Tyr $\rightarrow$ Phe dagegen geht die Möglichkeit zur Ausbildung einer Wasserstoff-Brückenbindung verloren. Die Sequenz beim Kaninchen unterscheidet sich am stärksten von anderen Spezies. Sie weist gegenüber dem Kalb 3 Substitutionen, sowie eine Deletion auf. Es findet daher auch mit keinem Antiserum eine Kreuzreaktion statt.

Betrachtet man den gesamten nicht helikalen Sequenzbereich (Abb.20,S.44), so wird deutlich, daß im Kaninchen bevorzugt gegen den Abschnitt des Kalbskollagens Antikörper gebildet werden, der die größten Unterschiede gegenüber dem Kaninchenkollagen aufweist. Es gibt aber auch Unterschiede im Bereich des Histidins, welches im Kaninchen fehlt oder durch Glycin ersetzt ist. Offenbar ist jedoch dieser Unterschied nicht ausreichend, um Antikörperproduktion zu stimulieren, oder diese wird durch die stärker stimulierende in der Nähe befindliche Determinante unterdrückt. Wechselseitige Beeinflussung verschiedener AD bezüglich der Auslösung einer Antikörperantwort wurden für Rattenkollagen beschrieben (56). Mit der Aufklärung zweier AD am α 1-CBO.1 des Kalbskollagens (35) wurde jedoch gezeigt, daß für die Erkennung einer AD durch das Kaninchen auch geringere Unterschiede als sie für den C-terminals Bereich gefunden wurden ausreichen.

Unter der plausiblen Annahme, daß die Sequenz von $\alpha 1$ -CBO und $\alpha 1$ -CB1 des Kaninchenkollagens dem Rattenkollagen entspricht (29), liegt im Bereich der einen AD nur der Austausch Leu $\rightarrow$ Met, im Bereich der zweiten AD der Austausch Thr $\rightarrow$ Ala und Ile $\rightarrow$ Val vor. Wird mit Rattenkollagen immunisiert, so können gegen diesen Sequenzbereich ($\alpha 1$ -CBO und $\alpha 1$ -CB1) keine Antikörper nachgewiesen werden (47).

Diese Ergebnisse sollten für Fragen des Mechanismus der natürlichen Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen von Interesse sein. Gegenwärtige Vorstellungen (57,21) nehmen an, daß zwar Immunzellen mit Rezeptoren gegen körpereigene Proteine gebildet, aber in primären Lymphorganen, wie z.B. dem Thymus, eliminiert oder paralysiert werden. Es ist anzunehmen, daß ein derartiger Prozess eine Reaktion mit körpereigenen Strukturen zur Voraussetzung hat. Die strukturelle Basis der Diskriminierung dieser Zellen ist zur Zeit unklar. Untersuchungen an geeigneten Modellen wie dem Kollagen, für das ein funktionell gleiches Protein in Organen des immunisierten Tieres vorliegt, könnten hier neue experimentelle Möglichkeiten eröffnen. Die Synthese von Peptiden des in Frage stehenden Sequenzbereichs ermöglicht die Herstellung künstlicher Hapten-Träger-Konjugate, deren immunogene Eigenschaften untersucht werden können. Systematische Variation in Richtung der körpereigenen Sequenz sollte dann Aussagen über die minimal notwendigen Unterschiede der Auslösung einer Immunantwort erlauben.

Die frühe Voraussage von Schmitt et al.(2), daß Tyrosinseitenketten eine maßgebende Rolle in den AD des Kollagens spielen, scheint für das Kaninchenmodell zutreffend zu sein, zumal dies auch für aminoterminalen Determinanten des Kollagens gefunden wurde (55). Für beide Determinanten

am $\alpha 1$ -CB6 vom Kalb wurde der Tyrosinrest in Position 26 als essentiell erkannt. Nicht zutreffend ist diese Regel aber für Kollagen-Antikörper die vom Huhn stammen. Bei diesem werden in erster Linie gegen zentrale Bereiche des Kollagens Antikörper gebildet, welche kein Tyrosin enthalten (42,43).

Die Sequenz Tyr-Tyr scheint dagegen zu keiner Antikörperstimulierung zu führen. Ein Grund mag sein, daß im Kaninchen dieselbe Sequenz auftritt und diese ein allgemeines Strukturprinzip der Säugetierkollagene darstellt. Desweiteren wurde stets mit säurelöslichem Kalbskollagen immunisiert, dessen intakte Struktur in Bezug auf diese Sequenz nicht voll gegeben war. Immunisierung mit Harnstoff-extrahierten Ketten müßten angeschlossen werden. Ebenfalls kann ein partieller Abbau des Antigens im Immuntier verhindern, daß bestimmte immunogene Strukturen zur Wirkung gelangen.

Durch degradierte Moleküle wie $\alpha 1$ -CB6^b können Antikörper gegen artifizielle AD gebildet werden, die mit der natürlichen Struktur des Antigens nicht mehr reagieren. Eine ähnliche künstliche AD konnte auch im C-terminalen Bereich des Rattenhautkollagens nachgewiesen werden (44). Solche Prozesse sind bei pathologischen Vorgängen in Betracht zu ziehen, wenn diese mit einer Degradation des Kollagens einhergehen. Es ist deshalb denkbar, daß bei chronisch entzündlichen Prozessen des Bindegewebes Autoantikörper gegen artifizielle Strukturen des Kollagens gebildet werden können. Für die Pathogenese der primär chronischen Polyarthrititis existiert von Steffen (54) eine Theorie, der Vorgänge dieser Art zugrunde liegen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Darstellung der Kollagenpräparate.

Säurelösliches Kalbshautkollagen (SLK) wurde aus dem Mittelspalt frischer Kalbshäute nach Pontz et al. (15) gewonnen. Die Extrakte wurden im letzten Schritt gegen 0,01 %ige EDTA-Lösung dialysiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der spezifischen optischen Drehung bei 405 nm ($[\alpha]_{405} = -1000^{\circ}$).

Proteolytisch vorbehandeltes SLK.

Durch Inkubation von nativem SLK (Kalb) mit α -Chymotrypsin (5) oder Pronase (33) konnten die nicht helikalen Bereiche des Moleküls abgespalten werden. Die Entfernung der Enzyme erfolgte durch zweimaliges Ausfällen von Kollagenfibrillen mit 15 %iger KCl-Lösung bei neutralem pH.

Neutralsalzlösliches Kollagen (NLK) aus Kaninchenhaut.

3 Wochen alte Kaninchen wurden durch Zusatz von 0,1 % β -Amino-propionitril-fumarat (BAPN) ins Trinkwasser lathyritisch gemacht (8). Nach 4 Wochen wurden sie geschlachtet und die rasierten und entfleischten Häute wie bei der Darstellung von Rattenhautkollagen beschrieben (9) extrahiert. Das in den Extrakten enthaltene Kollagen wurde durch zweifaches Umfällen und Wiederauflösen bei neutralem pH gereinigt.

Herstellung von Kollagen aus Harnstoffextrakten.

Mittelspalt aus Kalbshaut oder entfleischte und enthaarte Felle 7 Wochen alter lathyritischer Kaninchen wurden im Fleischwolf unter Eiskühlung zerkleinert. Die Extraktion mit 8 M Harnstoff (10 mg/g Feuchtgewicht) erfolgte für

2 Std. bei Raumtemperatur (RT) im Schüttelapparat. Die Harnstofflösung war durch Zugabe eines mixed-bed Ionenaustauschers (Amberlite MB-3, Serva) entionisiert; zur Entfernung des Austauschers wurde über Glaswatte filtriert. Der Extrakt wurde durch Zentrifugieren (30 Min. bei 23000 x g) geklärt. Kaninchenhautextrakte wurden zur Entfernung von emulgiertem Fett durch eine Lage von Zelith filtriert. Die klaren Extrakte wurden gegen 0,02 M Acetatpuffer pH 4,8 dialysiert oder über eine Biogel P-2-Säule, äquilibriert mit demselben Puffer, von Harnstoff befreit.

5.2. Darstellung der α -Ketten.

Die Kollagenextrakte wurden durch CM-Cellulose-Chromatographie nach (1) in die individuellen $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten aufgetrennt. Jeweils 200 mg SLK, pronasebehandeltes SLK oder eine empirisch ermittelte entsprechende Menge Harnstoff-extrahiertes Kollagen wurde 30 Min. bei 40°C denaturiert und auf eine bei 40°C thermostatisierte CM-Cellulose-Säule aufgetragen. Bei Harnstoffextrakten war ein Nachspülen mit Startpuffer nötig, um nichtkollagenes Material, das nicht von dem Austauscher retardiert wird, zu entfernen. Die den $\alpha 1$ -Ketten und $\alpha 2$ -Ketten entsprechenden Fraktionen wurden an Biogel P-2 entsalzt oder gegen 0,1 N Essigsäure dialysiert und lyophilisiert. Für die Rechromatographie unter identischen Bedingungen wurde gegen den Startpuffer dialysiert.

In einigen Fällen wurden Einzelketten an Agarose A 1.5 rechromatographiert, um von β -Komponenten (2 durch kovalente Bindung quervernetzte α -Ketten) freie Präparate zu erhalten. Reinheitskriterium war neben der chromatographischen Einheitlichkeit die Einheitlichkeit in der Disc-Elektrophorese in SDS.

5.3. Chromatographische Methoden.

Die verwendete chromatographische Trenneinheit bestand aus einer Säulenordnung, einer Peristaltikpumpe, einer Photometereinheit (Beckmann DB) mit Durchflußküvette und Schreiber und einem Fraktionsssammler mit Markierungszusatz. Der Proteingehalt der Säuleneeluete konnte bei 230 nm kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet werden. Bei Puffern mit hoher Eigenabsorption in diesem Wellenbereich wurden Aliquote der gesammelten Fraktionen mit Ninhydrin umgesetzt und bei 570 nm gemessen (Technicon Autoanalyser).

Molekularsiebchromatographie.

Für die Auftrennung kleiner Peptide vom Molekulargewicht 500-1500 wurden Biogel P-2 (200/400 mesh) oder Biogel-P-4-Säulen geeigneter Abmessung verwendet. Sie waren bei Raumtemperatur in 0,1 M Essigsäure äquilibriert. Biogel P-2-Säulen (100/200 mesh) wurden auch für die Entsalzung von Proteinlösungen eingesetzt.

Für größere Peptide waren auf 37°C thermostatisierte Säulen nötig, um Aggregation oder Renaturierung zu vermeiden. Verwendet wurden Säulen von Biogel P-10, P-150 sowie Sephadex G-50. Diese waren mit 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 4,5 äquilibriert. Agarose-Säulen waren mit 1 M CaCl_2 / 0,05 M Tris pH 7,8 äquilibriert und wurden bei Raumtemperatur verwendet.

Ionenaustauscherchromatographie.

Chromatographie an CM-Cellulose.

Sie wurde für Kettentrennungen nach Piez et al. (1) durchgeführt.

Die Chromatographie der Bromcyanpeptide (CNBr-Peptide)

in Citratpuffer pH 3,6 wurde nach Butler et al. (4) vorgenommen. Die Rechromatographie von CNBr-Peptiden bei niedrigerer Ionenstärke in Acetatpuffer pH 4,8 geschah nach Butler et al. (4) über einen linearen Gradienten von 0-0,16 M NaCl.

Chromatographie an Phosphorcellulose.

Die käufliche Phosphorcellulose (Whatman) wurde durch Quellen in 0,2 N NaOH gereinigt und durch vielfaches Sedimentieren von Feinpartikeln befreit. Es wurde in 1/1000 M Natriumacetat pH 3,6 bei 40°C chromatographiert und wahlweise lineare oder konkave NaCl-Gradienten von 0 bis maximal 0,6 M NaCl angelegt. Die Regenerierung des Säulenmaterials erfolgte mit 50fach konzentriertem Startpuffer.

Chromatographie an Dowex 1 X 2.

Die Auftrennung der tryptischen Peptide des $\alpha 1$ -CB6 erfolgte an Dowex 1 X 2 nach Schroeder (45), abgeändert von v.d.Mark et al. (24). Der Gradient überstrich den pH-Bereich von 9 - 3. Die Messung des Peptidgehaltes erfolgte mit der Ninhydrinreaktion.

Chromatographie an Dowex 50 X 2.

Eine Säule der Abmessung 1 x 10 cm wurde mit 1 N HCl in die H^+ -Form übergeführt und mit destilliertem Wasser gespült. Die Elution des Peptidgemisches erfolgte mit Wasser (50 ml). Unter den gewählten Bedingungen (46) werden alle Peptide und Aminosäuren mit freien Aminogruppen festgehalten, Peptide mit blockierten Aminogruppen werden nicht retardiert.

Präparative Hochspannungselektrophorese.

Das Peptidgemisch wurde ca. 5 cm breit auf Whatman Papier Nr. 1 (25 x 55 cm) aufgetragen. Der Laufpuffer war 0,25 M Pyridinacetat pH 5,4. Die Trennung erfolgte bei 3 KV für 2 Std. in einer Apparatur der Fa. Hölzl, Dorfen. Zur Identifizierung wurde ein Mittelstreifen aus dem Papier geschnitten und mit Ninhydrin angefärbt. Die Peptide wurden mit 0,1 N Essigsäure ausgewaschen.

5.4. Chemische und enzymatische Spaltungen.

Bromcyanspaltung nach Gross und Witkop (16).

α -Ketten oder SLK (10 mg/ml) wurden 30 Min. bei 40°C in 0,1 N Essigsäure denaturiert und die Lösung mit 6 N HCl auf pH 1,5 gebracht. Nach Spülung mit Stickstoff wurde 1 mg Bromcyan/mg Protein zugesetzt. Bei kleinen Peptiden wurde auf Denaturierung verzichtet, die Abbaukonzentration betrug 0,2 mg/ml. Nach der Reaktionszeit von 4 Std. bei 30°C wurde entweder entsalzt oder nach Verdünnung auf doppeltes Volumen mit Wasser lyophilisiert.

Trypsinspaltung.

Es wurde ausschließlich Trypsin verwendet, dessen chymotryptische Aktivität durch Umsetzung mit TPCK (36) blockiert war. Aus Ausgangsenzym diente Trypsin Worthington, doppelt krist. 20 mg Substrat wurden in 20 ml 0,2 M Ammoniumbikarbonat pH 7,8 gelöst und eine Lösung von 0,2 mg Enzym in 0,2 ml 1/1000 M Calciumchlorid zugesetzt. Nach 4 stündiger Inkubation bei 37°C wurde mit Essigsäure angesäuert und lyophilisiert.

Chymotrypsinspaltung.

Es wurde Kurzzeitspaltung von 40 Min. nach Stark et al. (5), sowie 8stündiger Abbau angewandt. Die sonstigen Bedingungen,

ausgenommen einem Enzym:Substratverhältnis von 1:50, entsprachen den unter Trypsinspaltung beschriebenen Angaben. Es wurde α -Chymotrypsin, Worthington, verwendet.

Kollagenasespaltung.

3 mg Substrat gelöst in 6 ml 0,005 M Tris/0,005 M CaCl_2 pH 7,5 wurde mit 0,03 mg Reinstkollagenase, Worthington CLSPA, gelöst in 30 μl Substratpuffer, versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde angesäuert und lyophilisiert.

5.5. Analytische Methoden.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Natrium-Dodecylsulfat.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wurde nach Furthmayr und Timpl (48) durchgeführt. Sie erlaubt neben der Reinheitsprüfung, nach Eichung mit Kollagenpeptiden bekannter Größe, die Abschätzung von Molekulargewichten. Für α -Ketten wurden 5 %ige, für Bromcyanpeptide 7,5 %ige Gele verwendet.

Aminosäureanalyse.

0,1 μmol Peptid wurde mit 1 ml 6 N HCl, die über SnCl_2 destilliert war, versetzt und unter Reinstickstoff 24 Std. bei 108°C hydrolysiert. Für homoserinhaltige Peptide wurde das im Vakuum eingedampfte Hydrolysat zur Lactonringöffnung 1 h bei 37°C mit 1 ml 1 %iger Piperidinlösung behandelt. Zur Korrektur für Hydrolyseverluste wurde für Threonin der Faktor 1,08 und für Serin 1,21 verwendet (24).

In den Tabellen der Aminosäureanalysen wurden die Werte, die mehr als 10 Reste pro Peptid ausmachen, auf ganz-

zählige Werte gerundet. Bei Prolin und Hydroxyprolin wurde davon abgewichen, um dem wechselnden Hydroxylierungsgrad Rechnung zu tragen. Ein Strich bedeutet weniger als 0,2 Reste pro Peptid.

Perameisensäureoxydation.

Zum Nachweis von α -Aminoadipinsäure-d-semialdehyd wurde die Oxydation zu α -Aminoadipinsäure mit Perameisensäure verwendet. Die Vorschrift entsprach der Methode von Moore (49) zur Oxydation von Cystein zu Cysteinsäure. Aminoadipinsäure wurde durch Vergleich mit synthetischem Material im Aminosäureanalysator identifiziert.

Molekulargewichtsbestimmung.

Es wurde neben der Disc-Elektrophorese-Methode in SDS die Gelchromatographie an Biogel P-150 oder - P-10 verwendet. Die Säulen waren mit Peptiden bekannten Molekulargewichts geeicht. Das Elutionsvolumen ist dabei proportional dem **Logarithmus des Molekulargewichts**. Bei der Elektrophorese wird anstelle des Elutionsvolumens die Wanderungsdistanz verwendet. Aus der Aminosäureanalyse wurde die Minimalgröße eines Peptids ermittelt. Zur Bestimmung der Zahl der Aminosäurereste pro Peptid wurde der größte gemeinsame Teiler aller μmol -Zahlen gesucht, der die beste Annäherung an ganzzahlige Werte ergab. Die Werte wurden mit dem durch die anderen Methoden bestimmten Molekulargewicht verglichen.

C-terminale Analysen.

Sie wurden mit Carboxypeptidase A, B oder C ausgeführt. Für Abbau mit CPA oder CPB (Worthington, DFP-behandelt) waren die Peptide in einer Konzentration von 1 mg/ml in 0,2 M N-Äthyl-morpholinacetat pH 8,5 gelöst (50). Die Enzyme wurden in 10 % Lithiumchlorid gelöst und im Gewichts-

verhältnis 1:25 bis 1:100 zugesetzt. Die Inkubationszeit (37°C) variierte von 1 bis 6 h. Für kinetische Untersuchungen wurden nach bestimmten Zeiten Aliquote abpipettiert und durch Ansäuern und Lyophilisieren abgestoppt. Ein Enzymansatz ohne Substrat, sowie in manchen Fällen ein Substratansatz ohne Enzym, diente als Kontrolle. Für den Abbau mit CPC stand ein Präparat der Firma Röhm und Haas, Darmstadt, 2500 U/mg, zur Verfügung. Die Umsetzung wurde in 0,1 M Natriumcitratpuffer pH 3,5 (51) vorgenommen. 100 mU/ μmol Peptid wurden 32 h bei 30°C inkubiert. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Aminosäureanalyse. Die Probe wurde an Biogel P-2 entsalzt und Protein- und Salzfraktion getrennt aufgefangen. Nach Hydrolyse des Proteins konnte die in der Salzfraktion vorhandene μmol -Menge abgespaltener Aminosäuren mit dem Rückhydrolysat verglichen werden.

Dünnschichtchromatographie.

Sie wurde auf Silicagel-G-Platten (Merck) ausgeführt. Als Laufmittel diente Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (60:20:6:24 Volumenanteile). In einem Fall wurde von der präparativen Anwendung Gebrauch gemacht: es wurde ein breiter Streifen aufgetragen und ein Mittelstreifen nach Abdecken der übrigen Partien mit Ninhydrin angefärbt. Nach Abkratzen der entsprechenden Schicht wurden die Peptide mit verdünnter Essigsäure ausgewaschen.

N-terminale Analyse.

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren diente die Dansyl-Methode nach Gray und Hartley (52).

10 nmol Peptid wurden in 20 μl 0,2 M NaHCO_3 gelöst und anschließend im Heizexsiccator zur Trockene eingedampft. Nach Wiederauflösung in 20 μl H_2O wurden 20 μl 50 % Dansylchlorid in Aceton zugesetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abdampfen der Flüssigkeit wurde

mit 0,1 ml 6 N HCl 4 h unter Stickstoff hydrolysiert. Die freigesetzte Dansylaminosäure wurde mit Äthylacetat extrahiert. Zum Nachweis diente zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit doppelseitig geschichteten Polyamidfolien (Schleicher und Schüll) 3 x 3 cm. Laufmittel war in der 1. Richtung 1,5 % Ameisensäure und in der 2. Richtung Benzol/Eisessig 9:1. Die Identifizierung erfolgte unter der UV-Lampe durch Vergleich mit einem Referenzgemisch auf der Plattenrückseite.

5.6. Immunologische Methoden.

Antiseren.

Ca. 2,5 kg schwere Kaninchen wurden jeweils mit 5 mg SLK subkutan immunisiert. Zur Verstärkung der Immunogenität war das in 0,05 M Essigsäure gelöste Kollagen im Verhältnis 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans intensiv vermischt. Die Applikation wurde 14tägig abwechselnd intraperitoneal ohne Adjuvans und subkutan mit Adjuvans wiederholt. Blutentnahmen zur Prüfung des Titors erfolgten aus der Ohrvene. Die Tiere wurden 7 Tage nach der 4. oder 6. Injektion unter Evipan-Narkose durch Herzpunktion entblutet.

Die Antiseren wurden über ein mit denaturiertem Kaninchenkollagen beladenes Immunadsorbens geschickt und der Durchlauf nach Ammonsulfatfällung auf das ursprüngliche Volumen konzentriert (34). Die Aufbewahrung erfolgte bei - 20°C.

Passive Hämagglutinationstechnik.

Zum Nachweis der Antikörper wurde der passive Hämagglutinationstest nach Stavitsky (32) in Abänderung von Steffen et al. (31) verwendet. Zur Beladung der tannier-

ten Erythrozyten wurden Vorratslösungen des Antigens in 2 M KSCN (10 mg/ml) 1:200 mit phosphatgepufferter 0,15 M NaCl-Lösung pH 6,4 verdünnt und gleichvolumig mit einer 2,5 %igen Erythrozytensuspension vermischt. Nach 10 Min. wurde das nicht gebundene Antigen ausgewaschen und eine 2,5 %ige Suspension der beladenen Erythrozyten hergestellt.

Agglutinationstest.

Jeweils 2 Tropfen einer geometrischen Verdünnungsreihe des Antiserums in 0,15 M NaCl wurde, beginnend mit der größten Verdünnung, mittels Pasteurpipetten auf gefelderte Glasplatten aufgetropft und anschließend auf dieselbe Weise je 1 Tropfen der sensibilisierten Erythrozyten hinzugefügt. Nach Vermischung der Reaktionspartner durch Schwenken der Platte konnte nach 8 Minuten die Agglutination abgelesen werden. Als Titer wurde die reziproke Verdünnung des Serums angegeben, die gerade noch eine Agglutination zeigte. Als Kontrolle dienten tannierte Erythrozyten.

Inhibitionstest.

Die Inhibitoren waren in 0,05 % Essigsäure gelöst. Mit Ausnahme kleiner Inhibitorpeptide wurden sie vor dem Test 30 Min. bei 45°C denaturiert und mit 0,2 Volumenanteilen 0,9 M NaCl/0,15 M Na₂HPO₄ neutralisiert. Die Endkonzentration betrug 1 bis 10 µmol/l. Zum Test wurde je ein Tropfen der Antiserumverdünnung und der Inhibitorlösung vermischt und nach 3 Minuten Reaktionszeit mit der Erythrozytensuspension versetzt. Die Ablesung erfolgte nach 8 Minuten. Die Inhibitionsaktivität ergibt sich als Titerdifferenz zum ursprünglichen Agglutinationstiter ohne Inhibitor.

6. Zusammenfassung.

Das Kollagenmolekül ist aus drei Polypeptidketten von je 1050 Aminosäuren aufgebaut. Eigenheit der Aminosäuresequenz dieser Ketten ermöglichen die Ausbildung einer Tripelhelix, wodurch ein steifes Stäbchenmolekül von 3000 Å Länge entsteht. An den beiden Enden des Moleküls weisen die Polypeptidketten jedoch kurze Sequenzen auf, die nicht zur Ausbildung einer Tripelhelix befähigt sind. Diese Bereiche werden im Gegensatz zu den helikalen Bereichen leicht von Proteasen abgespalten.

Mit Kollagen immunisierte Kaninchen produzieren eine heterogene Antikörperpopulation gegen verschiedene antigene Determinanten (AD) dieses Proteins. Man unterscheidet konformationsabhängige AD des Kollagens, die zur Reaktion mit dem Antikörper die native tripelhelikale Struktur des Moleküls benötigen und konformationsunabhängige AD, die mit denaturiertem Kollagen reagieren. Letztere werden in zentrale AD, die im helikalen Bereich liegen und in terminale AD, die im nicht helikalen Bereich lokalisiert sind, eingeteilt. Die Immunantwort des Kaninchens richtet sich hauptsächlich gegen die terminalen nicht helikalen Strukturen. Diese weisen verglichen mit dem übrigen Molekül auch die markantesten Speziesvariationen auf. Die wichtigste AD dieser Art beim Kalbskollagen befindet sich am C-terminalen Ende der $\alpha 1$ -Kette. Zur Aufklärung der Struktur dieser AD wurde von zwei carboxyterminalen CNBr-Peptiden der $\alpha 1$ -Kette, $\alpha 1$ -CB6^a und $\alpha 1$ -CB6^b ausgegangen. Es zeigte sich, daß beide Formen geringe Unterschiede in der Größe aufweisen, die auf das Fehlen einer nicht helikalen Sequenz von 18 Aminosäuren beim $\alpha 1$ -CB6^b zurückzuführen sind. Dem chemischen Unterschied entsprach ein serologischer; die Antiseren konnten in eine a-spezifische, nur mit $\alpha 1$ -CB6^a reagierende und in eine b-spezi-

fische Gruppe eingeteilt werden, die ausschließlich mit $\alpha 1\text{-CB6}^b$ reagiert.

Die Vermutung, daß $\alpha 1\text{-CB6}^b$ ein artifizielles Produkt aufgrund von proteolytischem Abbau während der Isolierung darstellt, wurde geprüft, indem $\alpha 1\text{-CB6}$ aus Kalbshaut präpariert wurde, die unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff extrahiert worden war. Dieses CNBr-Peptid, $\alpha 1\text{-CB6}^U$, war chemisch und serologisch einheitlich. Es zeigte die Spezifität von $\alpha 1\text{-CB6}^a$, enthielt aber einen Tyrosinrest mehr.

Zur weiteren Untersuchung der Unterschiede der drei Formen von $\alpha 1\text{-CB6}$ wurden deren carboxyterminale tryptische Peptide dargestellt. Zur selektiven Fraktionierung der Abbaugemische diente die serologische Aktivität der Peptide. Zu allen Formen des $\alpha 1\text{-CB6}$ konnten die carboxyterminalen tryptischen Peptide zugeordnet und Angaben über die Größe der nicht helikalen Bereiche gemacht werden.

Zur Aufklärung der Struktur der AD wurden die tryptischen Peptide weiter enzymatisch gespalten und anhand von Inhibitionstesten die maximalen und minimalen Größen der AD ermittelt. Für die a-spezifische Determinante wurde als minimale Größe die Sequenz Tyr-Asp-Leu-Ser-Phe-Leu ermittelt. Für die b-spezifische Determinante wurde die minimale Größe Tyr-Asp-LeuOH ermittelt, wobei sich die endständige Carboxylgruppe als essentieller Bestandteil der AD erwies.

Der zweite Teil der Arbeit sollte zur Kenntnis des Kollagens des Immuntieres, dem Kaninchen, beitragen und Aussagen über die Determinante am Kalbskollagen homologe Struktur des Kaninchenkollagens machen.

Es wurden zehn CNBr-Peptide der $\alpha 1$ -Kette des Kaninchens gefunden. Unterschiede zur $\alpha 1$ -Kette des Kalbskollagens ergaben sich in den N- und C-terminalen Bereichen, wo jeweils ein Methioninrest zusätzlich auftritt. Der Methioninrest im C-terminalen Teil ist Bestandteil der nicht helikalen Sequenz, wodurch zu deren Untersuchung von zwei CNBr-Peptiden, $\alpha 1$ -CB6A und $\alpha 1$ -CB6B, ausgegangen werden mußte. Zusätzlich konnte ein beide Peptide überlappendes Brückenpeptid isoliert werden. Anhand der bekannten Sequenz beim Kalb konnte eine vorläufige Sequenz des nicht helikalen Bereichs beim Kaninchen aufgestellt und die der Kalbsdeterminante homologe Sequenz beim Kaninchen angegeben werden.

Anhand von Kreuzreaktionen von $\alpha 1$ -CB6-spezifischen Anti-Kalbseren mit $\alpha 1$ -CB6 anderer Spezies konnte eine Parallelität zwischen der Stärke der Kreuzreaktion und der Zahl der Aminosäuresubstitutionen festgestellt werden.

7. Literatur

1. Piez, K.A., Eigner, E.A., Lewis, M.S.
Biochemistry 2, 58 (1963)
2. Schmitt, F.O., Gross, J., und Highberger, J.H.
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 39, 459 (1953)
3. Mark, K.v.d., Wendt, P., Rexrodt, F. und Kühn K.
FEBS Lett. 11, 105 (1970)
4. Butler, W.T., Piez, K.A., und Bornstein P.
Biochemistry 6, 3771 (1967)
5. Stark, M., Rauterberg, J., und Kühn K.
FEBS Lett. 13, 101 (1971)
6. Schmitt, F.O., Levine, L., Drake, M., Rubin, A.,
Pfahl, D. und Davison, P.F.
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 51, 493 (1964)
7. Kühn, K. und Eggl, M.
Biochem. Z. 344, 215 (1966)
8. Piez, K.A.
Ann. Rev. Biochem. 37, 547 (1968)
9. Bornstein, P., und Piez, K.A.
Biochemistry 5, 3460 (1966).
10. Traub, W. und Piez, K.A.
Adv. Prot. Chem. Vol 25, Academic Press, Inc.
New York (1971)
11. Arnon R. und Sela M.
Biochem. J. 75, 103 (1960)
12. Kirrane, J.A. und Robertson, W.van B.
Immunology 14, 139 (1968)
13. Steffen, C. und Timpl R.
Z. Immun.-Forsch. 129, 469 (1965)
14. Kettman, J.R., Benjamini, E., Michaeli, D. und
Leung, C.Y.
Biochem. biophys. Res. Commun. 29, 623 (1967)
15. Pontz, B., Meigel, W., Rauterberg, J. und Kühn, K.
FEBS Lett. 9, 11 (1970)
16. Gross, E., und Witkop, B.
J. biol. Chem. 237, 1856 (1962)

17. Pontz,B., Meigel,W., Rauterberg,J., Kühn,K.,
Eur. J. Biochem., 16,50, (1970)
18. Fietzek, P.P., Rexrodt,F., Wendt,P., Stark,M. und
Kühn,K.
Eur. J. Biochem. 30, 163, (1972)
19. Rauterberg,J., Fietzek,P.P., Rexrodt,F., Becker,U.,
Stark,M. und Kühn,K.
FEBS Lett. 21,75, (1972)
20. Rauterberg,J. und Kühn,K.
Eur. J. Biochem. 19,398, (1971)
21. Jerne,N.K.
Eur. J. Immunol. 1,1, (1971)
22. Wendt,P., Mark,K.v.d., Rexrodt,F. und Kühn,K.
Eur. J. Biochem. (1972), in Druck
23. Furthmayr, H.,
unveröffentlichte Ergebnisse
24. Mark,K.v.d., Rexrodt,F., Wendt,P. und Kühn,K.
Eur. J. Biochem., 16, 143, (1970)
25. Kang,A.H., Piez,K.A. und Gross, J.
Biochemistry 8, 150, (1969)
26. Wendt,P., Fietzek,P.P. und Kühn,K.
FEBS Lett. in Druck, (1972)
27. Stoltz,M. Timpl,R. und Kühn,K.
FEBS Lett. 26,61, (1972)
28. Kang,A .H. und Gross,J.
Biochemistry 9,796, (1970)
29. Bornstein,P.
Biochemistry 8,63, (1969)
30. Timpl,R., Furthmayr,H., Steffen,C. und Doleschel,W.
Z. Immun. Forsch. 134,391, (1967)
31. Steffen,C., Timpl,R. und Wolff,J.
Immunology, 15,135, (1968)
32. Stavitsky,A.B.,
J. Immunol. 72,360, (1954)
33. Timpl,R., Beil,W., Furthmayr,H.,Meigel,W.
und Pontz,B.
Immunology 21,1017, (1973)

34. Timpl, R., Wolff, J., Furthmayr, H. und Steffen, C.
Immunology 15, 145 (1968)
35. Rauterberg, J., Timpl, R., Furthmayr, H.
Eur. J. Biochem. 27, 231 (1972)
36. Kostka, V. und Carpenter, F.H.
J. Biol. Chem. 239, 1799 (1964)
37. Young, J.D., Benjamini, E., Stewart, J.M. und
Leung, C.Y.
Biochemistry 6, 1455 (1967)
38. Crumpton, M.J., Law, H.D. und Strong, R.C.
Biochem. J. 116, 923 (1970)
39. Mitchell, B. und Levy, J.G.
Biochemistry 9, 2762 (1970)
40. Crumpton, M.J.
Nature, 215, 17 (1967)
41. Bornstein, P. und Nesse, R.
Arch. Biochem. Biophys. 138, 443 (1970)
42. Beil, W., Furthmayr, H., und Timpl, R.
Immunochemistry 9, 779 (1972)
43. Furthmayr, H., Stoltz, M., Becker, U., Beil, W.
und Timpl, R.
Immunochemistry, 9, 789 (1972)
44. Stoltz, M.
Dissertation, München 1972
45. Schroeder, W.A.
in Methods in Enzymology XI. S. 361
46. Press, E.M., Piggot, P.J. und Porter, R.R.
Biochem. J. 99, 356 (1966)
47. Lindsley, H., Mannik, M. und Bornstein, P.
J. Exper. Med. Vol. 133, Nr. 6, 1309 (1971)
48. Furthmayr, H. und Timpl, R.
Anal. Biochem. 41, 510 (1971)
49. Moore, S.
J. Biol. Chem. 238, 235 (1963)
50. Ambler, R.P.
in Methods in Enzymology XI (14) S. 155

51. Zuber,H.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349,1337, (1968)
52. Gray, W.R. und Hartley,D.S.
Biochem. J. 89, 379, (1963)
53. Rubin,A.L., Pfahl,D., Speakman,P.T.,
Davison,P.F. und Schmitt,F.O.
Science 139, 37, (1963)
54. Steffen,C.,
Z. Immun. Forsch. 139,219, (1970)
55. Furthmayr,H. und Timpl,R.
Biochem. Biophys.Res. Comm. 47,944, (1972)
56. Timpl,R., Furthmayr,H. und Beil,W.
J. Immunol. 108, 119, (1972)
57. Burnet,M.
Cellular Immunology,
Cambridge Univ. Press (1970)

Lebenslauf.

Am 25.2.1944 wurde ich als Sohn des Versicherungskaufmanns Anton Becker und seiner Frau Lydia in Villingen geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Villingen und Nürnberg trat ich 1954 in die dortige Oberrealschule ein. Von 1955 bis 1956 besuchte ich die Oberrealschule in Augsburg und ab 1956 die Gisela-Oberrealschule in München, wo ich im Juni 1963 die Reifeprüfung ablegte.

An der Universität München begann ich Ende 1963 das Studium der Chemie. Nach einem einjährigen Auslandsaufenthalt als Stipendiat, legte ich im September 1969 die Diplomchemiker-Hauptprüfung in München ab und schloß im September 1970 mein Studium mit der Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. K. Kühn am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung ab.

Seither arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof. Kühn an der vorliegenden Arbeit.

